

METHODS AND COMPOSITIONS FOR SYNTHESIS OF LONG CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN PLANTS

Publication number: JP2001527395T

Publication date: 2001-12-25

Inventor:

Applicant:

Classification:


- International: **A23D9/00; A23K1/16; A23L1/29; A23L1/30; C12N9/02; C12N15/53; C12N15/81; C12N15/82; C12N15/83; C12P7/64; A61K38/00; A23D9/00; A23K1/16; A23L1/29; A23L1/30; C12N9/02; C12N15/53; C12N15/81; C12N15/82; C12N15/83; C12P7/64; A61K38/00; (IPC1-7): C12N15/09; A01H5/00; A23D9/007; A23K1/16; A23L1/30; A61K31/20; A61P3/02; C11B1/00; C11C3/00; C12N5/10; C12N15/09; C12R1/645**

- european: **A23D9/00; A23K1/16I; A23L1/29F; A23L1/30C2; C12N9/02L99; C12N9/02L99B; C12N15/81; C12N15/82C4B4; C12P7/64**

Application number: JP19980544175T 19980410

Priority number(s): US19970833610 19970411; WO1998US07421 19980410; US19970834033 19970411; US19970834655 19970411; US19970956985 19971024

Also published as:

 WO9846764 (A1)
WO9846764 (A1)
WO9846764 (A1)
EP0996732 (A1)
EP0996732 (A1)
EP0996732 (A1)
EP0996732 (A0)
CA2285939 (A1)
EP0996732 (B1)
TR9902474T (T2)
DE69830587T (T2)
AU720677B (B2)

less <<

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2001527395T

Abstract of corresponding document: **WO9846764**

The present invention relates to compositions and methods for preparing polyunsaturated long chain fatty acids in plants, plant parts and plant cells, such as leaves, roots, fruits and seeds. Nucleic acid sequences and constructs encoding fatty acid desaturases, including DELTA 5-desaturases, DELTA 6-desaturases and DELTA 12-desaturases, are used to generate transgenic plants, plant parts and cells which contain and express one or more transgenes encoding one or more desaturases. Expression of the desaturases with different substrate specificities in the plant system permit the large scale production of polyunsaturated long chain fatty acids such as docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, alpha-linolenic acid, gamma-linolenic acid, arachidonic acid and the like for modification of the fatty acid profile of plants, plant parts and tissues. Manipulation of the fatty acid profiles allows for the production of commercial quantities of novel plant oils and products.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-527395
(P2001-527395A)

(43) 公表日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A
A 0 1 H 5/00		A 2 3 K 1/16	3 0 4 C
A 2 3 D 9/007		A 2 3 L 1/30	Z
A 2 3 K 1/16	3 0 4	A 6 1 K 31/20	
A 2 3 L 1/30		A 6 1 P 3/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 229 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-544175
(86) (22) 出願日 平成10年4月10日 (1998. 4. 10)
(85) 翻訳文提出日 平成11年10月6日 (1999. 10. 6)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 0 7 4 2 1
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 4 6 7 6 4
(87) 国際公開日 平成10年10月22日 (1998. 10. 22)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 8 3 3 , 6 1 0
(32) 優先日 平成9年4月11日 (1997. 4. 11)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 8 3 4 , 0 3 3
(32) 優先日 平成9年4月11日 (1997. 4. 11)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

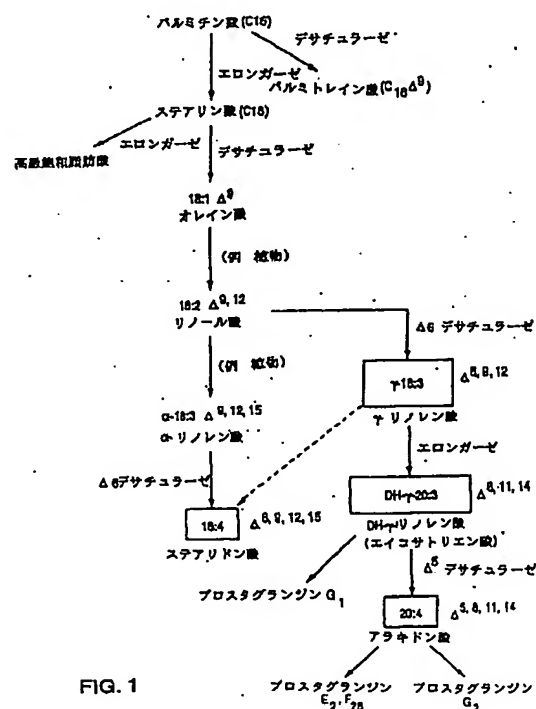
(71) 出願人 カルジーン エル エル シー
アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア
州, デイビス, フィフス ストリート
1920
(71) 出願人 アボット ラボラトリーズ
アメリカ合衆国 60064-3500 イリノイ
州, アボット パーク, アボット パーク
ロード 100
(72) 発明者 ナットソン, デボラ
アメリカ合衆国 95746 カリフォルニア
州, グラナイト ベイ, ロックハースト
ウェイ 6110
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物における長鎖多不飽和脂肪酸の合成のための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、植物、植物部位および植物細胞、例えば葉、根、果実および種子などにおいて、多不飽和長鎖脂肪酸を調製するための組成物および方法に関する。Δ5-デサチュラーゼ、Δ6-デサチュラーゼおよびΔ12-デサチュラーゼを含む脂肪酸デサチュラーゼをコードする核酸配列および構築物を使用して、1以上のデサチュラーゼをコードする1以上のトランスジェーンを含み且つ発現するトランスジェニック植物、植物部位および細胞を作出する。植物系における異なる基質特異性を有するデサチュラーゼの発現により、植物、植物部位および組織の脂肪酸プロファイルの改変のための多不飽和長鎖脂肪酸（ドコサヘキサン酸、エイコサペンタン酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸、アラキドン酸などの）の大量生産が可能となる。脂肪酸プロファイルの操作により、商品価値のある新規植物油および製品の生産が可能となる。



【特許請求の範囲】

1. 配列番号1、配列番号3、および配列番号5からなる群より選択される配列番号に示す1つ以上のヌクレオチド配列を含む核酸構築物であって、該1つ以上のヌクレオチド配列が異種ヌクレオチド配列と連結している、上記の核酸構築物。
2. 配列番号1、配列番号3、および配列番号5からなる群より選択される配列番号に示す1つ以上のヌクレオチド配列を含む核酸構築物であって、該1つ以上のヌクレオチド配列が植物細胞において機能する発現制御配列と機能しうる形で連結されている、上記の核酸構築物。
3. 前記核酸配列が約60%未満の平均A+T含有量を有する、請求項2に記載の核酸構築物
4. 前記核酸配列が真菌に由来する、請求項2に記載の核酸構築物。
5. 前記真菌がMortierella属のものである、請求項4に記載の核酸構築物
6. 前記真菌がsalpin種のものである、請求項5に記載の核酸構築物。
7. 配列番号2に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物であって、該ヌクレオチド配列が植物細胞で機能する転写制御配列または発現制御配列と機能しうる形で連結され、脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から6番目の炭素で不飽和化する機能的活性ポリペプチドをコードする、上記の核酸構築物。
8. 配列番号4に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物であって、該ヌクレオチド配列が植物細胞で機能する転写制御配列または発現制御配列と機能しうる形で連結され、脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から12番目の炭素で不飽和化する機能的活性ポリペプチドをコードする、上記の核酸構築物。
9. 配列番号6に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物であって、該ヌクレオチド配列が植物細胞で機能する転写制御配列または発現制御配列と機能しうる形で連結され、脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から5番目の炭素で不飽和化する機能

的活性ポリペプチドをコードする、上記の核酸構築物。

10. 配列番号2、配列番号4、および配列番号6からなる群より選択される配列番号に示すアミノ酸配列を有する機能的活性デサチュラーゼをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む核酸構築物であって、該ヌクレオチド配列が植物細胞で機能するプロモーターと機能しうる形で連結されている、上記の核酸構築物。
11. 前記植物細胞が種子細胞である、請求項10に記載の核酸構築物
12. 前記種子細胞が胚細胞である、請求項11に記載の核酸構築物。
13. 多不飽和脂肪酸の産生をもたらす少なくとも1つの機能的活性 *Mortierella alpina* 脂肪酸デサチュラーゼをコードする少なくとも1コピーのDNA配列を含む組換え植物細胞であって、該脂肪酸デサチュラーゼは配列番号2、配列番号4、および配列番号6からなる群より選択される配列番号に示すアミノ酸配列を有し、該細胞は該DNA配列を含むベクターで形質転換され、該DNA配列は発現制御配列と機能しうる形で連結されている、上記の組換え植物細胞。
14. 前記多不飽和脂肪酸がLA、ARA、GLA、DGLA、SDAおよびEPAからなる群より選択される、請求項13に記載の組換え植物細胞。
15. 前記組換え植物細胞が18:1、18:2、18:3および18:4からなる群より選択される脂肪酸に富んでいる、請求項13に記載の組換え植物細胞。
16. 前記植物細胞がナタネ、大豆、ペニバナ、トウモロコシ、亜麻およびヒマワリからなる群より選択される、請求項15に記載の組換え植物細胞。
17. 前記発現制御配列が前記植物細胞に対して内因性である、請求項16に記載の組換え植物細胞。
18. 請求項16の組換え植物細胞によって発現される1つ以上の植物油。
19. 脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から5番目の炭素で不飽和化するトランスジーン発現産物をコードするトランスジーンを含む細胞を有する植物を栽培する工程を含む改変型長鎖多不飽和脂肪酸生合成を得るための方法であって、該トランスジーンが発現されて該細胞において長鎖不飽和脂肪酸生合成が改変されるような条件下で該トランスジーンが発現制御配列

と機能しうる形で連結している、上記の方法。

20. 真菌または藻類に由来し、脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から5番目の炭素、6番目の炭素および12番目の炭素からなる群より選択される炭素で不飽和化するトランスジーン発現産物をコードする1つ以上のトランスジーンを含む細胞を有する植物を栽培する工程を含む改変型長鎖多不飽和脂肪酸生合成を得るための方法であって、該1つ以上のトランスジーンが発現されて該細胞において長鎖不飽和脂肪酸生合成が改変されるような条件下で該トランスジーンが発現制御配列と機能しうる形で連結している、上記の方法。
21. 前記長鎖多不飽和脂肪酸が、LA、ARA、GLA、DGLA、SDAおよびEPAからなる群より選択される、請求項19または20に記載の方法。
22. 請求項19または20の方法により産生される、植物油またはその画分。
23. 治療または予防をもたらすのに十分な量の請求項22の植物油を、治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、栄養不良を治療または予防するための方法。
24. 請求項22の植物油または画分、および製薬上許容可能な担体を含む医薬組成物。
25. 固体または液体の形態である、請求項24に記載の医薬組成物。
26. カプセルまたは錠剤の形態である、請求項25に記載の医薬組成物。
27. ビタミン、ミネラル、炭水化物、糖、アミノ酸、遊離脂肪酸、リン脂質、抗酸化剤およびフェノール化合物からなる群より選択される少なくとも1つの栄養素をさらに含む、請求項24記載の医薬組成物。
28. 請求項22に記載の植物油またはその画分を含む栄養配合物。
29. 前記栄養配合物が、乳幼児用配合物、食物補充剤および食物代用物からなる群より選択される、請求項28に記載の栄養配合物。
30. 前記乳幼児用配合物、食物補充剤および食物代用物が液体または固体の形態である、請求項29に記載の栄養配合物。
31. 請求項22に記載の植物油または画分を含む乳幼児用配合物。
32. ヤシ油、大豆油、カノラ油、モノおよびジグリセリド、グルコース、食用

ラクトース、電気透析されたホエー、電気透析された脱脂乳、乳ホエー、大豆タンパク質ならびに他のタンパク質加水分解物からなる群より選択される少なくとも1つの多量栄養素をさらに含む、請求項31に記載の乳幼児用配合物。

33. ビタミンA、C、D、EおよびB複合体からなる群より選択される少なくとも1つのビタミン、ならびにカルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、ナトリウム、カリウム、リン、銅、塩化物、ヨウ素、セレンおよび鉄からなる群より選択される少なくとも1つのミネラルをさらに含む、請求項32に記載の乳幼児用配合物。
34. 請求項22に記載の植物油またはその画分を含む食物補充剤。
35. ヤシ油、大豆油、カノラ油、モノおよびジグリセリド、グルコース、食用ラクトース、電気透析されたホエー、電気透析された脱脂乳、乳ホエー、大豆タンパク質ならびに他のタンパク質加水分解物からなる群より選択される少なくとも1つの多量栄養素をさらに含む、請求項34に記載の食物補充剤。
36. ビタミンA、C、D、EおよびB複合体からなる群より選択される少なくとも1つのビタミン、ならびにカルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、ナトリウム、カリウム、リン、銅、塩化物、ヨウ素、セレンおよび鉄からなる群より選択される少なくとも1つのミネラルをさらに含む、請求項35に記載の食物補充剤。
37. ヒトまたは動物に投与される、請求項34または36に記載の食物補充剤。
38. 請求項22の植物油またはその画分を含む食物代用物。
39. ヤシ油、大豆油、カノラ油、モノおよびジグリセリド、グルコース、食用ラクトース、電気透析されたホエー、電気透析された脱脂乳、乳ホエー、大豆タンパク質ならびに他のタンパク質加水分解物からなる群より選択される少なくとも1つの多量栄養素をさらに含む、請求項38に記載の食物代用物。
40. ビタミンA、C、D、EおよびB複合体からなる群より選択される少なくとも1つのビタミン、ならびにカルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、ナトリウム、カリウム、リン、銅、塩化物、ヨウ素、セレンおよび鉄からなる群より選択される少なくとも1つのミネラルをさらに含む、請求項39に

記

載の食物代用物。

41. ヒトまたは動物に投与される、請求項38または40に記載の食物代用物。
42. 治療をもたらすのに十分な量の請求項38の食物代用物または請求項34の食物補充剤を患者に投与することを含む、多飽和脂肪酸の不十分な摂取または産生により引き起こされる状態を有する患者を治療する方法。
43. 前記食物代用物または前記食物補充剤が経腸的または非経口的に投与される、請求項42に記載の方法。
44. 請求項22の植物油またはその画分を含む、化粧品。
45. 局所塗布される、請求項44に記載の化粧品。
46. ヒトまたは動物に投与される、請求項24に記載の医薬組成物。
47. 請求項22の植物油またはその画分を含む、動物用食餌。
48. 配列番号38～配列番号44からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離されたヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は植物細胞において発現される、上記のヌクレオチド配列。
49. 前記真菌が*Nortierella*種である、請求項20に記載の方法。
50. 前記真菌が*Morierella alpina*である、請求項49に記載の方法。
51. 配列番号49～配列番号50からなる群より選択される、単離されたヌクレオチド配列であって、該配列は植物細胞において発現される、上記のヌクレオチド配列。

【発明の詳細な説明】

植物における長鎖多不飽和脂肪酸の合成のための方法および組成物

関連出願

本出願は、1997年4月11日付け米国特許出願第08/834,655号の一部継続出願であり、1997年4月11日付け米国特許出願第08/833,610号、1997年4月11日付け米国特許出願第08/834,033号、および1997年10月24日付け米国特許出願第08/956,985号の一部継続出願であり、その開示内容は本明細書中に参考として組み込まれる。

序論

発明の分野

本発明は、宿主植物における長鎖多不飽和脂肪酸 (PUFAS) の産生量を変えることができる酵素および／または酵素成分のレベルのモジュレーションに関する。本発明は、植物における PUFAS の産生により例示する。

背景

多不飽和脂肪酸 (PUFA) の2つの主要ファミリーは、アラキドン酸などの ω^3 脂肪酸およびエイコサペンタエン酸などの ω^6 脂肪酸である。PUFAは細胞の形質膜の重要な成分であり、それは該形質膜においてリン脂質のような形態で見出される。また、PUFAは、プロスタサイクリン、ロイコトリエン、およびプロスタグランジンなどのヒトおよび動物において重要な他の分子の前駆体として機能する。PUFAは、適切な発達、特に乳幼児の脳の発達、ならびに組織の形成および修復に必要である。

重要な4つの主要長鎖PUFAには、種々のタイプの魚油中に主として見出されるドコサヘキサエン酸 (DHA) およびエイコサペンタエン酸 (EPA)、メマツヨイグサ (*Oenothera biennis*)、ルリチシャ (*Borago officinalis*) およびクロフサスグリ (*Ribes nigrum*) などの多数の植物の種子中に見出される γ -リノレン酸

(GLA)、ならびに海洋油および植物種子中に見出されるステアリドン酸 (SDA) が含まれる。GLAおよびもう1つの重要な長鎖PUFAであるアラキドン酸 (ARA) は共に、糸状菌中に見出される。ARAは、肝臓、副腎などの動物組織から精製するこ

とができる。

DHAに関しては、種々の海洋生物、冷水海洋魚から得た油および卵黄画分などの多数の商業的製造起源が存在する。ARAに関しては、*Mortierella*属、*Entomophthora*属、*Phytium*属および*Porphyridium*属を含む微生物を、商業的製造に使用することができる。SDAの商業的起源には、*Trichodesma*属および*Echium*属が含まれる。GLAの商業的起源には、メマツヨイグサ、クロフサスグリおよびルリチシャが含まれる。しかしながら、天然起源からPUFAを商業的に製造することに関連したいくつかの欠点がある。動物、植物などのPUFAの天然起源は、非常に不均一な油組成を有する傾向にある。したがって、これらの起源から得た油は、1以上の所望のPUFAを分離したり又は1以上のPUFAに富む油を製造するためには、徹底的な精製を要する可能性がある。また、天然起源は、入手可能性において、制御できない変動にさらされる。魚類のストック (stocks) は、自然変異を受けたり、あるいは乱獲により枯渇する可能性がある。魚油は不快な風味および香りを有し、それは、所望の製品から経済的に分離することが不可能な場合があり、そのような製品を食物補充剤として許容できなくする場合がある。動物油、および特に魚油は、環境汚染物質を蓄積する可能性がある。天候および疾患が、魚および植物の両方の起源からの収量の変動を引き起こす可能性がある。代替油産生作物の生産のための利用可能な農耕地は、人口の一定の増加と、それに関連した、残りの耕地上の食物生産に対する需要の増加とからの競合にさらされる。PUFAを産生する作物（例えば、ルリチシャ）は、商業的栽培に順応化されておらず、単一栽培においては十分に得られない可能性がある。したがって、そのような作物の栽培は、より有益かつ定評ある作物の栽培が可能な場合には、経済的な競争力を有さない。また、*Mortierella*などの生物の大規模発酵は非常に高くつく。天然動物組織は、少量のARAしか含有せず、加工が困難である。*Porphyridium*、*Mortierella*などの微生物は、商業的規模で培養することが困難である。

PUFAを含有する食物補充剤および医薬製剤は、PUFA源の欠点を保有している可能性がある。魚油カプセルなどの補充剤は、特定の所望の成分を低レベルでしか含有していないことがあり、したがって大用量を要する。高用量は、汚染物を含

む望ましくない成分の高レベル摂取につながる。過剰添加は、内因性生合成経路の阻害を引き起こし、*in vivo*における種々の脂質画分中の他の必要な脂肪酸との競合を引き起こし、望ましくない結果を招く可能性があるため、脂肪酸補充剤を与える際には注意しなければならない。例えば、 ω^3 脂肪酸に富む食物を摂取するエスキモー人は、高い出血傾向を有する(米国特許第4,874,603号)。該補充剤の不快な風味および香りは、そのような投与計画を望ましくないものにするところがあり、患者による応諾を妨げる可能性がある。

PUFAの生合成には多数の酵素が関与している。リノール酸 (LA, 18:2 $\Delta^9, 12$) は、 Δ^{12} -デサチュラーゼによりオレイン酸 (18:1 Δ^9) から産生される。GLA (18:3 $\Delta^6, 9, 12$) は、 Δ^6 -デサチュラーゼによりリノール酸 (LA, 18:2 $\Delta^9, 12$) から産生される。DGLA (20:3 $\Delta^8, 11, 14$) からのARA (20:4 $\Delta^5, 8, 11, 14$) の産生は、 Δ^5 -デサチュラーゼにより触媒される。しかしながら、動物は、 Δ^9 位を超えて不飽和化することができないため、オレイン酸 (18:1 Δ^9) をリノール酸 (18:2 $\Delta^9, 12$) に変換することができない。同様に、哺乳類は、 α -リノレン酸 (ALA, 18:3 $\Delta^9, 12, 15$) を合成することができない。真菌および植物を含む他の真核生物は、 Δ^{21} および Δ^{15} 位で不飽和化する酵素を有する。したがって、動物の主要な多不飽和脂肪酸は、食物に由来するか、および/または、リノール酸 (18:2 $\Delta^9, 12$) もしくは ∞ リノレン酸 (18:3 $\Delta^9, 12, 15$) の不飽和化および伸長に由来する。

多不飽和脂肪酸は、栄養学的、薬学的、産業的な目的や、他の目的において有用であると考えられる。天然起源から得た、および化学合成による多不飽和脂肪酸の供給の拡大では、商業的な需要には十分ではない。したがって、これらの脂肪酸を天然で産生する種から、PUFAの生合成に関与する遺伝物質を得ること、および商業的量の1以上のPUFASを産生するよう操作することができる異種系において該単離物を単独でまたは組み合わせで発現させることに、関心が持たれている。

本発明はさらに、本発明の長鎖脂肪酸を含む液体または固体の形態である、配合物または食物補充剤に関する。これらの配合物および補充剤は、ヒトまたは動

物に投与することができる。

本発明の配合物および補充剤は、ヤシ油、大豆油、カノラ油、モノおよびジグリセリド、グルコース、食用ラクトース、電気透析されたホエー、電気透析された脱脂乳、乳ホエー、大豆タンパク質ならびに他のタンパク質加水分解物よりなる群から選ばれる少なくとも1つの多量栄養素を更に含むことが可能である。

本発明の配合物は、ビタミンA、C、D、EおよびB複合体よりなる群から選ばれる少なくとも1つのビタミンと、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、ナトリウム、カリウム、リン、銅、塩化物、ヨウ素、セレンおよび鉄よりなる群から選ばれる少なくとも1つのミネラルとを更に含むことが可能である。

本発明はさらに、多不飽和脂肪酸の不十分な摂取または産生により引き起こされる状態を有する患者の治療方法であって、該患者の治療を行なうのに十分な量の本発明の食物代用物を該患者に投与することを含んでなる方法に関する。

本発明はさらに、本発明の物質の化粧用および医薬組成物に関する。

本発明はさらに、製薬上許容される担体中のトランスジェニック油に関する。
本発明はさらに、トランスジェニック油を含有する栄養補充剤、化粧剤および乳幼児用配合物に関する。

本発明はさらに、脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から5、5または12番目の炭素において不飽和化するトランスジーン発現産物をコードするトランスジーンを含有する細胞を有する微生物を増殖させる工程を含んでなる、改変された長鎖多不飽和脂肪酸生合成を得るための方法であって、該トランスジーンが発現されて該細胞内の長鎖多不飽和脂肪酸の生合成が改変される条件下、該トランスジーンが、機能しうる形で発現制御配列に連結されていることを特徴とする方法に関する。

本発明はさらに、ビタミン、ミネラル、炭水化物、糖、アミノ酸、遊離脂肪酸、リン脂質、抗酸化剤およびフェノール化合物からなる群より選択される少なくとも1つの栄養素を含む、医薬組成物に関する。

関連文献

Δ⁶-デサチュラーゼによるγ-リノレン酸の製造は、米国特許第5,552,306号お

よび米国特許第5,614,393号に記載されている。Mofortierella alpinaを使用する8,11-エイコサジエン酸の製造は、米国特許第5,376,541号に開示されている。双鞭毛藻類によるドコサヘキサエン酸の製造は、米国特許第5,407,957号に記載されている。ルリチシャからの Δ^6 -デサチュラーゼのクローニングは、PCT公開WO 96/21022に記載されている。 Δ^9 -デサチュラーゼのクローニングは、公開されている特許出願PCT WO 91/13972、EP 0 550 162 ALEP 0 561 569 A2、EP 0 644 263 A2およびEP 0 736 598 A1および米国特許第5,057,419号に記載されている。種々の生物からの Δ^{12} -デサチュラーゼのクローニングは、PCT公開WO 94/11516および米国特許第5,443,974号に記載されている。種々の生物からの Δ^{15} -デサチュラーゼのクローニングは、PCT公開WO 93/11245に記載されている。Thumbergia alataからの Δ^6 パルミトイル-アシル輸送タンパク質デサチュラーゼおよび大腸菌中でのその発現は、米国特許第5,614,400号に記載されている。35Sプロモーターを用いたトランスジェニック大豆胚における大豆ステアシル-ACPデサチュラーゼの発現は、米国特許第5,443,974号に開示されている。

発明の概要

植物および植物細胞における多不飽和長鎖脂肪酸およびデサチュラーゼの製造のための新規組成物および方法を提供する。該方法は、宿主植物細胞内で機能する発現カセットで形質転換した目的の宿主植物細胞を増殖することを含み、該発現カセットは、PUFAの産生をモジュレートすることができるデサチュラーゼポリペプチドをコードするDNA配列にリーディングフレーム5'で結合した転写および翻訳開始制御領域を含んでなる。該デサチュラーゼポリペプチドの発現は、PUFA生合成に関与する酵素の濃度の変化の結果として、宿主植物細胞の該PUFAのプロフィールの変化をもたらす。特に興味深いのは、植物組織および／または葉、根、果実および種子などの植物部位におけるPUFA産生の選択的制御である。本発明は、例えばDHA、EPA、ARAおよびGLAの大量生産、および食用植物組織お

よび／または植物部位の脂肪酸プロフィールの修正に有用である。

本発明はさらに、配列番号1～配列番号52に記載のヌクレオチドおよびペプチド配列に実質的に関連するまたは相同である精製されたヌクレオチド配列または

ポリペプチド配列をさらに含む。本発明はさらに、発現系の成分として及びトランスジェニック油の製造に有用な系の成分として関連配列を同定するためのプローブとして、配列番号1~40に記載の配列を使用する方法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、藻類、*Mortierella*およびヒトを含む種々の生物に由来するパルミチン酸 (C_{16}) からアラキドン酸 (20:4 Δ 5, 8, 11, 14) およびステアリドン酸 (18:4 Δ 6, 9, 12, 15) の合成のための可能な経路を示す。これらのPUFAは、ヒトおよび他の動物に重要な他の分子 (プロスタサイクリン、ロイコトリエンおよびプロスタグランジンを含み、それらのいくつかが示されている) の前駆体として機能することが可能である。

図2は、種々の生物からまとめた、ARAに加えてEPAおよびDHAを含むPUFAの産生のための可能な経路を示す。

図3A~Eは、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼのDNA配列 (配列番号1) および推定アミノ酸配列 (配列番号2) を示す。

図4は、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼアミノ酸と、他の Δ 6デサチュラーゼおよび関連配列 (配列番号7、8、9、10、11、12および13) とのアラインメントを示す。

図5A~Dは、*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼのDNA配列 (配列番号3) および推定アミノ酸配列 (配列番号4) を示す。

図6は、PCR断片の推定アミノ酸配列 (配列番号14) を示す (実施例1を参照されたい)。

図7A~Dは、*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼのDNA配列 (配列番号5) を示す。

図8は、*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼのタンパク質配列 (配列番号6) と、 Δ 6デサチュラーゼおよび関連配列 (配列番号15、16、17、18) とのア

ラインメントを示す。

図9は、Ma29のタンパク質配列およびコンティグ253538aとのアラインメントを

示す。

図10は、Ma524のタンパク質配列およびコンテイング253538aとのアライメントを示す。

配列表の簡単な説明

配列番号1は、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼのDNA配列を示す。

配列番号2は、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号3は、*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼのDNA配列を示す。

配列番号4は、*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号5は、*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼのDNA配列を示す。

配列番号6は、*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号7~13は、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼに関連するアミノ酸配列を示す。

配列番号14は、実施例1のPCR断片のアミノ酸配列を示す。

配列番号15~18は、*Mortierella alpina* Δ 5および Δ 6デサチュラーゼに関連するアミノ酸配列を示す。

配列番号19~30は、PCRプライマー配列を示す。

配列番号31~37は、ヒトヌクレオチド配列を示す。

配列番号38~44は、ヒトペプチド配列を示す。

配列番号45および配列番号46は、*Dictyostelium discoideum* デサチュラーゼのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

配列番号47~50は、*Schizochytrium* cDNAクローンのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

好適な実施の形態の説明

本発明の完全な理解を保証するために、以下の定義を記載する。

Δ 5-デサチュラーゼ： Δ 5デサチュラーゼは、脂肪酸分子のカルボキシル末端

から5番目の炭素（炭素5）と6番目の炭素（炭素6）との間に二重結合を導入する酵素である。

△6-デサチュラーゼ：△6デサチュラーゼは、脂肪酸分子のカルボキシル末端から6番目の炭素（炭素6）と7番目の炭素（炭素7）との間に二重結合を導入する酵素である。

△9-デサチュラーゼ：△9デサチュラーゼは、脂肪酸分子のカルボキシル末端から9番目の炭素（炭素9）と10番目の炭素（炭素10）との間に二重結合を導入する酵素である。

△12-デサチュラーゼ：△12デサチュラーゼは、脂肪酸分子のカルボキシル末端から12番目の炭素（炭素12）と13番目の炭素（炭素13）との間に二重結合を導入する酵素である。

脂肪酸：脂肪酸は、長い炭化水素鎖および末端カルボキシル基を含有する化合物のクラスである。脂肪酸には、以下のものが含まれる。

脂肪酸		
12:0	ラウリン酸	
16:0	パルミチン酸	
16:1	パルミトレイン酸	
18:0	ステアリン酸	
18:1	オレイン酸	△9-18:1
18:2 △5,9	タキソレイン酸 (taxoleic acid)	△5,9-18:2
18:2 △6,9	6,9-オクタデカジエン酸	△6,9-18:2
18:2	リノール酸	△9,12-18:2 (LA)
18:3 △6,9,12	γ-リノレン酸	△6,9,12-18:3 (GLA)
18:3 △5,9,12	ピノレン酸 (pinolenic acid)	△5,9,12-18:3
18:3	α-リノレン酸	△9,12,15-18:3 (ALA)
18:4	ステアリドン酸	△6,9,12,15-18:4 (SDA)
20:0	アラキジン酸	
20:1	エイコセン酸 (Eicoscenic Acid)	

22:0	ベヘニン酸 (behehic acid)	
22:1	エルカ酸	
22:2	ドカサジエン酸 (Docasadienoic acid)	
20:4 ω 6	アラキドン酸	Δ 5, 8, 11, 14-20:4 (ARA)
20:3 ω 6	ω 6-エイコサトリエン酸 ジホモ- γ リノレン酸	Δ 8, 11, 14-20:3 (DGLA)
20:5 ω 3	エイコサペンタン酸 (チムノドン酸 (Timnodonic acid))	Δ 5, 8, 11, 14, 17-20:5 (EPA)
20:3 ω 3	ω 3-エイコサトリエン酸	Δ 11, 16, 17-20:3
20:4 ω 3	ω 3-エイコサテトラエン酸	Δ 8, 11, 14, 17-20:4
22:5 ω 3	ドカサペンタエン酸	Δ 7, 10, 13, 16, 19-22:5(ω 3 DPA)
22:6 ω 3	ドコサヘキサエン酸 (セルボン酸 (cervonic acid))	Δ 4, 7, 10, 13, 16, 19-22:6 (DHA)
24:0	リグノセリン酸	

これらの定義を考慮した上で、本発明は、植物細胞の多不飽和長鎖脂肪酸含量の改変を可能にする新規DNA配列、DNA構築物、方法および組成物を提供する。植物細胞内において1以上のPUFAの量を増加させることができるポリペプチドをコードするDNAを含む発現カセットで、植物細胞を形質転換する。望ましくは、宿主細胞のゲノムに該発現カセットを組み込む組込みを与えられた構築物を調製し得る。デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするセンスまたはアンチセンスDNAを発現するよう、宿主細胞を操作する。「デサチュラーゼ」は、1以上の脂肪酸を不飽和化して関心のあるモノ-もしくは多-不飽和脂肪酸またはその前駆体を与えうるポリペプチドを意味する。「ポリペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）とは無関係に、アミノ酸の任意の鎖を意味する。発現される酵素の基質は、宿主細胞により産生されるか、あるいは外因的に供給されることが可能である。

宿主細胞内において発現を達成するために、該形質転換DNAを、該宿主細胞内で機能的である転写および翻訳の開始および終結調節領域に、機能しうる形で連結する。発現される遺伝子を含む構築物は、宿主細胞のゲノム内への組込みを引

き起こすことが可能であり、あるいは宿主細胞内で自律複製することが可能である。リノール酸 (LA) の産生の場合、一般に使用する発現カセットには、特にオレイン酸を産生し又は取込みうる宿主細胞内で $\Delta 12$ -デサチュラーゼ活性を与えるカセットが含まれる。ALAの産生の場合、一般に使用する発現カセットには、特にLAを産生し又は取込みうる宿主細胞内で $\Delta 15$ -もしくは $\omega 3$ -デサチュラーゼ活性を与えるカセットが含まれる。GLAまたはSDAの産生の場合、一般に使用する発現カセットには、特にLAまたはALAをそれぞれ産生し又は取込みうる宿主細胞内で $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性を与えるカセットが含まれる。LAやGLAなどの $\omega 6$ 型不飽和脂肪酸の産生は、 $\Delta 15$ または $\omega 3$ 型デサチュラーゼの活性を阻害することによりALAを産生することができる植物において行われるのが好ましい。これは、アンチセンス $\Delta 15$ または $\omega 3$ 転写産物のための発現カセットを付与することにより、または $\Delta 15$ -または $\omega 3$ -デサチュラーゼ遺伝子を破壊することにより、達成される。同様に、LAやALAの産生は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ活性を有する植物内において、アンチセンス $\Delta 6$ 転写産物のための発現カセットを付与することにより、または $\Delta 6$ -デサチュラーゼ遺伝子を破壊することにより、行われるのが好ましい。同様に、オレイン酸の産生は、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ活性を有する植物内において、アンチセンス $\Delta 12$ 転写産物のための発現カセットを付与することにより、または $\Delta 12$ -デサチュラーゼ遺伝子を破壊することにより、行われるのが好ましい。ARAの産生の場合、一般に使用する発現カセットは、特にDGLAを産生し又は取込みうる宿主細胞内で $\Delta 5$ -デサチュラーゼ活性を与える。ARAなどの $\omega 6$ 型不飽和脂肪酸の産生は、 $\Delta 15$ または $\omega 3$ 型デサチュラーゼの活性を阻害することによりALAを産生することができる植物において行われるのが好ましい。これは、アンチセンス $\Delta 15$ または $\omega 3$ 転写産物のための発現カセットを付与することにより、または $\Delta 15$ -または $\omega 3$ -デサチュラーゼ遺伝子を破壊することにより、達成される。

トランスジェニック植物による脂肪酸の製造

トランスジェニック植物によるPUFAの製造は、魚または植物などの天然起源からの精製より優れたいくつかの利点を有する。組換え植物からの脂肪酸の製造

は、宿主内に新たな合成経路を付与することにより、あるいは望ましくない経路を抑制し、それにより望ましいPUFAまたはそのコンジュゲート化形態のレベルを増加させ、望ましくないPUFAのレベルを減少させることにより、天然に生じる植物的脂肪酸プロファイルを改変することが可能となる。また、トランスジェニック植物における脂肪酸の産生は、特定の組織および／または植物部位におけるデサチュラーゼ遺伝子の発現が、これらの組織および／または部位における所望のPUFAレベルの大幅な増加を達成することができることを意味し、これらの組織からより経済的に回収することができるという利点を提供する。例えば、所望のPUFAは種子の中で発現することができ、種子油を単離する方法が確立されている。所望のPUFAを精製するための起源を与えることに加えて、種子油成分を、デサチュラーゼ遺伝子（単独でまたは伸長酵素（elongase）などの他の遺伝子とともに）の発現を介して操作し、特定のPUFAプロファイルを有する種子油を濃縮した形で提供することができる。次に、母乳による授乳が不可能または望ましくない場合、あるいは大人および幼児の両方が栄養失調であるか病気である場合、この濃縮した種子油を動物のミルクおよび／または合成もしくは半合成ミルクに加えて乳幼児用配合物として使用することができる。

PUFAの製造には、宿主細胞、基質の利用可能性、および所望の最終産物に応じて、いくつかのポリペプチド、特にデサチュラーゼが、ステアリン酸からオレイン酸へ、LAからGLAへ、ALAからSDAへ、オレイン酸からLAへ、またはLAからALAへの変換を触媒するポリペプチドを含め、関心が持たれる。これらには、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ または $\omega 3$ 位置で不飽和化する酵素が含まれる。デサチュラーゼ活性を有する特定のポリペプチドの選択のための考慮事項には、該ポリペプチドの最適pH該ポリペプチドが律速酵素またはその成分であるか否か、使用するデサチュラーゼが所望の多不飽和脂肪酸および／または該ポリペプチドにより要求される補因子の合成に必須であるか否かが含まれる。発現されるポリペプチドは、好ましくは、宿主細胞におけるその位置の生化学的環境に適合したパラメーターを有する。例えば、該ポリペプチドは、基質に関して宿主細胞内の他の酵素と競合する必要があるかもしれない。したがって、所定の宿主細胞内でのPUFA産生を改変するための所定のポリペプチドの適合性の決定の際には、問題

のポリペプチドの K_m および比活性の分析を考慮する。したがって、ある特定の状況において使用するポリペプチドは、意図される宿主細胞内に存在する条件下で機能しうるものであるが、その他の点では、所望のPUFAの相対的産生を改変しうる所望の特性を有するデサチュラーゼ活性を有する任意のポリペプチドであることが可能である。パルミチン酸 (C_{16}) からのアラキドン酸 ($20:4 \Delta 5, 8, 11, 14$) の合成スキームを、図1に示す。この経路における鍵酵素は、DH- γ -リノレン酸 (DGLA、エイコサトリエン酸) をARAに変換する $\Delta 5$ -デサチュラーゼである。また、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼによる α -リノレン酸 (ALA) からステアリドン酸への変換が示されている。ARAに加えてEPAおよびDHAを含むPUFAの産生を、図2に示す。ステアリン酸 (C_{18}) からのアラキドン酸 ($20:4 \Delta 5, 8, 11, 14$) の合成における鍵酵素は、リノール酸を γ -リノレン酸に変換する $\Delta 6$ -デサチュラーゼである。 $\Delta 6$ -デサチュラーゼによる α -リノレン酸 (ALA) のステアリドン酸 (stearidonic acid) への変換も示されている。ARAの製造では、使用されるDNA配列は、 $\Delta 5$ -デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。特定の場合、これは、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドの産生を与える発現カセットと、および任意で、 $\Delta 15$ 転写産物に対するアンチセンス配列の産生を与える転写カセットとに、結合することができる。使用されるカセットの組み合わせの選択は、一部には、宿主細胞のPUFAプロフィールに依存する。宿主細胞の $\Delta 5$ -デサチュラーゼ活性が制限されている場合は、 $\Delta 5$ -デサチュラーゼの過剰発現だけで、ARA産生を増強するのに十分であろう。

デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドの起源

デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの起源は、所望の多不飽和脂肪酸を産生する生物である。一例として、ARAを産生する能力を有する微生物を、 $\Delta 5$ -デサチュラーゼ遺伝子の起源として使用することができる (GLAまたはSDAが $\Delta 6$ -デサチュラーゼおよび/または $\Delta 12$ -デサチュラーゼ遺伝子の起源として使用することができる微生物)。そのような微生物には、例えば、*Mortierella*、*Conidiobolus*、*Pythium*、*Phytophthora*、*Penicillium*、*Porphyridium*、*Coidosporium*、*Mucor*、

Fusarium, *Aspergillus*, *Rhodotorula*および*Entomophthora*属に属する微生物が含まれる。*Porphyridium*属のなかで特に関心が持たれるのは、*Porphyridium cruentum*である。*Mortierella*属のなかで特に関心が持たれるのは、*Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila*, *Mortierella ramanniana*, var. *angulispora*および*Mortierella alpina*である。*Mucor*属のなかで特に関心が持たれるのは、*Mucor cinelloides*および*Mucor javanicus*である。

所望のデサチュラーゼをコードするDNAは、種々の方法で同定することができる。一例として、所望のデサチュラーゼの起源、例えば、*Mortierella*由来のゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを、酵素的または化学的に合成された検出可能なプローブ（これは、DNA、RNAまたは非天然に存在するヌクレオチドまたはそれらの混合物から作製することができる）でスクリーニングする。通常の又は減少したストリンジェンシーのハイブリダイゼーション法のためには、プローブを、公知のデサチュラーゼのDNAから酵素的に合成することができる。また、オリゴヌクレオチドプローブは、起源をスクリーニングするために使用することが可能であり、公知デサチュラーゼ間で保存された配列を含む公知デサチュラーゼの配列、または所望の精製タンパク質から得たペプチド配列に基づくことが可能である。アミノ酸配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブは、遺伝暗号の縮重を含むように縮重していることが可能であり、あるいは起源生物の好ましいコドンを優先するよう偏っていることが可能である。また、オリゴヌクレオチドは、公知の又は疑わしい起源からの逆転写mRNAからのPCRのためのプライマーとして使用することができ、該PCR産物は、完全長cDNAであることが可能であり、あるいは所望の完全長cDNAを得るためのプローブを作製するために使用することが可能である。別法として、所望のタンパク質を、完全に配列決定し、そのポリペプチドをコードするDNAの全合成を行なうことができる。

所望のゲノムまたはcDNAを単離したら、それを公知方法により配列決定することができる。当技術分野においては、そのような方法は過誤を受けやすいと認識されており、そのため同一領域の多重配列決定が常套手段となっているが、それでもなお、反復ドメイン、広範な二次構造または異常な塩基組成を有する領域

(例えば、高いGC塩基含量を有する領域)においては特に、得られる推定配列内の無視できない過誤率を招くと予想される。相違が生じる場合には、再び配列決定を行なうことができ、特別な方法を用いることができる。特別な方法には、異なる温度；異なる酵素；より高次の構造を形成するオリゴヌクレオチドの能力を改変するタンパク質；改変ヌクレオチド、例えばITPまたはメチル化dGTP；異なるゲル組成、例えば、ホルムアルデヒドの添加；異なるプライマーまたは問題の領域から異なる距離に位置するプライマー；または異なる鋳型、例えば一本鎖DNAを用いることによる配列決定条件の改変を含めることができる。また、mRNAの配列決定を用いることができる。

通例、デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドのコード配列の一部または全部は、天然由来である。しかしながら、場合によっては、例えば、宿主に好ましいコドンを用いることにより発現を増強するために、コドンの全部または一部を改変することが望ましい。宿主に好ましいコドンは、関心のある特定の宿主種において最大量で発現されるタンパク質における最高頻度のコドンから決定することができる。したがって、デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドのコード配列の全部または一部を合成することができる。また、転写されるmRNA中に存在する任意の不安定化配列または二次構造の領域を除去するよう、該DNAの全部または一部を合成することができる。また、塩基組成を、所望の宿主細胞において更に好ましいものに改変するために、該DNAの全部または一部を合成することができる。配列を合成し配列を合体させるための方法は、文献において十分に確立されている。所望の多不飽和脂肪酸のより長い半減期またはより高い産生速度などの宿主細胞における機能に関するより望ましい物理的および速度論的パラメータを有するin vivoデサチュラーゼ活性を有するポリペプチドが産生されるように天然に存在するデサチュラーゼ遺伝子の突然変異を得るために、in vitro突然変異誘発および選択、部位特異的突然変異誘発または他の手段を用いることができる。

望ましいcDNAは、60%未満のA+T組成、好ましくは50%未満のA+T組成を有する。20塩基対のスライディングウィンドウの局在化スケールでは、75%未満のA+T組成を有するcDNAの局所化領域がないことが好ましく、60塩基対のウィ

ンドウでは、60%を超えるA+T組成を有するcDNAの局在化領域がないことが好ましく、55%を超えるA+T組成を有するcDNAの局在化領域がないことがより好ましい。

Mortierella alpinaデサチュラーゼ

特に関心が持たれるのは、*Mortierella alpina*の Δ 5-デサチュラーゼ、 Δ 6-デサチュラーゼおよび Δ 12-デサチュラーゼである。 Δ 5-デサチュラーゼは446アミノ酸を有し、このアミノ酸配列は図7に示される。DGLAからARAのより著しい合成を達成するために、*Mortierella alpina*の Δ 5-デサチュラーゼをコードする遺伝子をトランスジェニック微生物内で発現させることができる。また、*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼDNAと配列が実質的に同一であるか、または*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼポリペプチドと配列が実質的に同一であるポリペプチドをコードする他のDNAを使用することもできる。*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼは、457アミノ酸および51.8kDの推定分子量を有し、そのアミノ酸配列は、図3に示される。リノール酸からGLA、またはALAからステアリン酸 (SDA) の、より著しい合成を達成するために、*Mortierella alpina*の Δ 6-デサチュラーゼをコードする遺伝子をトランスジェニック植物または動物内で発現させることができる。また、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼDNAと配列が実質的に同一であるか、または*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼポリペプチドと配列が実質的に同一であるポリペプチドをコードする他のDNAを使用することもできる。

Mortierella alpina Δ 12-デサチュラーゼは、図5に示されたアミノ酸配列を有する。オレイン酸からLAのより著しい合成を達成するために、*Mortierella alpina*の Δ 12-デサチュラーゼをコードする遺伝子をトランスジェニック植物内で発現させることができる。また、*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼDNAと実質的に同一であるか、または*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼポリペプチドと実質的に同一であるポリペプチドをコードする他のDNAを使用することもできる。

配列が実質的に同一は、*Mortierella alpina* Δ 5-デサチュラーゼのアミノ酸

配列または該アミノ酸配列をコードする核酸配列に対して少なくとも60%、80%、90%または95%（この順序で好ましさが増加する）の相同性を示すアミノ酸配列または核酸配列を意味する。ポリペプチドの場合には、比較配列の長さは、一般には少なくとも16アミノ酸、好ましくは少なくとも20アミノ酸、最も好ましくは35アミノ酸である。核酸の場合には、比較配列の長さは、一般には少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも60ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも75ヌクレオチド、最も好ましくは110ヌクレオチドである。相同性は、典型的には、配列分析ソフトウェア、例えばGenetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705, MEGAlign (DNASTar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wisconsin 53715) およびMacVector (Oxford Molecular Group, 2105 S. Bascom Avenue, Suite 200, Campbell, California 95008) のSequence Analysisソフトウェアパッケージを使用して測定する。そのようなソフトウェアは、種々の置換、欠失および他の修飾に対する相同性の度合を当てはめることにより同様の配列同士を突き合わせる。保存的置換には、典型的には、以下の基の範囲内での置換が含まれる：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシンおよびロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびトレオニン；リシンおよびアルギニン；およびフェニルアラニンおよびチロシン。また、置換は、保存された疎水性または親水性に基づいて (KyteおよびDoolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982) あるいは同様のポリペプチド二次構造をとる能力に基づいて (ChouおよびFasman, Adv. Enzymol. 47:45-148, 1978) 行なうことが可能である。

他のデサチュラーゼ

本発明には、同じまたは他の生物に由来する関連デサチュラーゼが含まれる。そのような関連デサチュラーゼには、Mortiere11の同じまたは異なる種内の天然に存在する開示されている $\Delta 5$ -、 $\Delta 6$ -および $\Delta 12$ -デサチュラーゼ変異体、ならびに他の種に由来する開示されている $\Delta 5$ -デサチュラーゼの相同体、およびデサチュラーゼ活性を有する進化上関連するタンパク質が含まれる。また、

Mortierella alpina Δ 5-デサチュラーゼと実質的に同一ではないが、脂肪酸分子のカルボキシル末端からそれぞれ5番目、6番目または12番目の炭素において脂肪酸分子を不飽和化するデサチュラーゼも含まれる。関連デサチュラーゼは、開示されているデサチュラーゼと実質的に同様に機能するそれらの能力（すなわち、依然としてDGLAをARAに、LAをGLAに、またはオレイン酸をLAに有効に変換する能力）により同定することができる。また、開示されているデサチュラーゼに基づくプローブを、起源生物から構築されたライブラリーにハイブリダイズさせることにより、あるいは起源生物に由来するmRNAおよび開示されているデサチュラーゼに基づくプライマーを使用するRT-PCRにより、開示されているデサチュラーゼに相同な配列に関して配列データベースをスクリーニングすることによっても関連デサチュラーゼを同定することができる。そのようなデサチュラーゼには、ヒト、*Dictyostelium discoideum*および*Phaeodactylum tricornutum*に由来するものが含まれる。

デサチュラーゼ活性に重要なデサチュラーゼポリペプチドの領域は、通常の突然変異誘発、生じる突然変異ポリペプチドの発現、およびそれらの活性の測定により決定することができる。突然変異体には、欠失、挿入および点突然変異またはそれらの組合せを含めることができる。典型的な機能分析は、欠失突然変異誘発から開始して、機能に必要なタンパク質のNおよびC末端境界を決定し、ついで内部欠失、挿入または点突然変異体を作製して、機能に必要な領域を更に決定する。また、カセット突然変異誘発または全合成などの他の技術を用いることもできる。例えば、5'または3'コード領域を順次除去するためにエキソヌクLEASEを使用することにより、欠失突然変異誘発を行なう。そのような技術のためのキットが入手可能である。欠失後、開始または停止コドンを含むオリゴヌクレオチドを、それぞれ5'または3'の欠失の後に該欠失コード領域に連結することにより、該コード領域は完成する。別法として、開始または停止コドンをコードするオリゴヌクレオチドを、部位特異的突然変異誘発、突然変異PCRなどの種々の方法により、あるいは既存の制限部位で消化されたDNAに対する連結により、該コード領域に挿入する。内部欠失は、部位特異的突然変異誘発または突然変異原性PCRを介した突然変異原性プライマーの使用による、DNA内の既存の制限部

位の使用などの種々の方法により、同様に作製することができる。挿入は、リンカーキャニング突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発または突然変異原性PCRなどの方法により作製する。点突然変異は、部位特異的突然変異誘発または突然変異原性PCRなどの技術により作製する。

また、活性に重要なデサチュラーゼポリペプチドの領域を同定するために、化学突然変異誘発を用いることができる。突然変異構築物を発現させ、得られた改変タンパク質がデサチュラーゼとして機能する能力をアッセイする。そのような構造-機能分析により、どの領域を欠失させることが可能か、どの領域が挿入を許容するか、およびどの点突然変異が、該突然変異タンパク質が天然デサチュラーゼと実質的に同様に機能するのを可能にするのかを判定することができる。そのようなすべての突然変異タンパク質およびそれをコードするヌクレオチド配列は、本発明の範囲内である。

デサチュラーゼ遺伝子の発現

デサチュラーゼポリペプチドをコードするDNAが得られたら、それを宿主細胞内で複製可能なベクター内に配置し、あるいはそのようなPCRまたはロング (long) PCRなどの技術により *in vitro* で増殖させる。複製ベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルス、コスミドなどを含めることができる。望ましいベクターには、関心のある遺伝子の突然変異誘発に又は宿主細胞内での関心のある遺伝子の発現に有用なものが含まれる。ロングPCRの技術は、大きな構築物の *in vitro* 増殖を可能にし、その結果、関心のある遺伝子に対する修飾、例えば、突然変異誘発または発現シグナルの付加、および得られた構築物の増殖を、複製ベクターまたは宿主細胞を使用することなく、完全に *in vitro* で行なうことができる。

デサチュラーゼポリペプチドの発現のために、機能的な転写および翻訳の開始および終結領域を、デサチュラーゼポリペプチドをコードするDNAに、機能しうる形で連結させる。転写および翻訳の開始および終結領域は、発現させるDNA、所望の系内での発現が可能であることが公知の又は疑わしい遺伝子、発現ベクター、化学合成などの種々の非排他的起源に由来するか、または宿主細胞内の内因性遺伝子座に由来する。植物組織および/または植物部位における発現は、特に

、該組織または部位が簡単に収穫できるもの、例えば種子、葉、果実、花、根などである場合、一定の効率を示す。発現は、特定の制御配列（例えば米国特許第5,463,174号、米国特許第4,943,674号、米国特許第5,106,739号、米国特許第5,175,095号、米国特許第5,420,034号、米国特許第5,188,958号および米国特許第5,589,397号のものなど）を用いて植物内のその位置にターゲッティングすることができる。あるいは、発現されるタンパク質は、宿主植物からの液体画分の中に直接もしくはさらなる修飾により取りこまれうる産物を生成する酵素であることができる。本件では、デサチュラーゼ遺伝子の発現、またはアンチセンスデサチュラーゼの転写により、植物部位および／または植物組織内に見られる特定のPUFA、またはその誘導体のレベルを改変することができる。Δ⁵-デサチュラーゼポリペプチドのコード領域は、より高い割合の所望のPUFAを含む組織および／または植物部位を生成するために、単独でもしくは他の遺伝子とともに発現する。または、この場合PUFA組成はヒト母乳のそれに非常に似通っている(Prietoら、PCT公開WO95/24494)。終結領域は、開始領域が由来する起源から得られた遺伝子の3'側領域から得られたものでもよいし、異なる遺伝子から得られたものであってもよい。多くの終結領域が知られており、同じまたは異なる属および種からの種々の宿主において申し分ないものであることが分かっている。終結領域は通常、任意の特定の特性によるというよりは、簡便さの問題で選択される。

宿主細胞の選択は、トランスジェニック細胞の所望のPUFAプロフィール、および宿主細胞の天然プロフィールにより部分的に影響を受ける。1例として、オレイン酸からリノール酸を製造する場合、使用するDNA配列はΔ¹²-デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、リノール酸からGLAを製造する場合、使用するDNA配列はΔ⁶-デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。Δ¹²-デサチュラーゼ活性を発現し且つΔ¹⁵-デサチュラーゼ活性が欠如または枯渇している宿主細胞の使用は、Δ⁶-デサチュラーゼのみを過剰発現する発現カセットとともに使用することができ、この使用はトランスジェニック細胞内でのGLAの産生を増加させるのに十分である。宿主細胞がΔ⁹-デサチュラーゼ活性を

発現する場合、Δ¹²-およびΔ⁶-デサチュラーゼ両方を発現させることにより、G

LA産生を増強させることができる。特に $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性の発現が $\Delta 12$ -デサチュラーゼ活性の発現と組み合わせさせた場合、宿主細胞は低 $\Delta 15$ -デサチュラーゼ活性を天然に有するかまたはそのように突然変異させられることが望ましい。あるいは、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼ発現のための宿主細胞は、高 $\Delta 12$ -デサチュラーゼ活性を天然に有するかまたはそのように突然変異させられてもよい。

宿主細胞内での発現は、一過性または安定に達成することができる。一過性発現は、宿主細胞内で機能的である発現シグナルを含有する導入された構築物（しかしながら、この構築物は複製されず、めったに宿主細胞内に組込まれないか又は該宿主細胞は増殖性でない）から生じることが可能である。また、関心のある遺伝子に機能しうる形で連結された調節可能なプロモーターの活性を導入することにより、一過性発現を達成することができる（ただし、そのような誘導系は、低い基底レベルの発現を示すことが多い）。安定発現は、宿主ゲノム内に組込まれうる又は宿主細胞内で自律複製する構築物の導入により達成することができる。関心のある遺伝子の安定発現は、該発現構築物上に位置するか又は該発現構築物でトランスフェクトされた選択マーカーの使用により選択し、ついで該マーカーを発現する細胞に関して選択することができる。安定発現が組込みから生じる場合には、構築物の組込みは、宿主ゲノム内でランダムに生じることが可能であり、あるいは宿主遺伝子座との組換えを標的化するのに十分な程度に宿主ゲノムに相同な領域を含有する構築物の使用により標的化されることが可能である。構築物を内因性遺伝子座に標的化する場合には、該転写および翻訳調節領域の全部または一部は、該内因性遺伝子座により付与されることが可能である。

起源植物内でのデサチュラーゼポリペプチドの発現の増加が望ましい場合には、いくつかの方法を用いることができる。デサチュラーゼポリペプチドをコードする追加的遺伝子を、宿主生物内に導入することができる。また、天然デサチュラーゼ遺伝子座からの発現は、例えば、より強力なプロモーターを宿主ゲノム内に挿入して発現の増強を引き起こすことにより、あるいは不安定化配列を、その情報を該宿主ゲノムから欠失させて該mRNAまたは該コード化タンパク質から除去することにより、あるいは該mRNAに安定化配列を付加することにより、相同組

換えを介して増加させることができる(米国特許第5,500,365号を参照のこと)。

異なる2以上の遺伝子、適当な調節領域および発現方法を発現させることが望ましい場合には、導入された遺伝子を、複製ベクターの使用により又は宿主ゲノム内への組込みにより、宿主細胞内で増殖させることができる。別々の複製ベクターから2以上の遺伝子を発現させる場合には、各ベクターが、異なる複製手段を有することが望ましい。安定発現を維持し、構築物間の要素の再構築を妨げるために、導入された各構築物は、組込まれているか否かにかかわらず、異なる選択手段を有すべきであり、その他の構築物に対する相同性を欠くべきである。調節領域、選択手段および導入構築物の増殖方法の賢明な選択は、すべての導入遺伝子が必要なレベルで発現されて所望の産物の合成がもたらされるよう、実験的に決定することができる。

関心のある遺伝子を含む構築物は、標準的な技術により宿主細胞内に導入することができる。これらの技術には、トランスフェクション、感染、ボリスチック(bolistic) 衝撃、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、擦り取り、または関心のある遺伝子を宿主細胞内に導入する他の任意の方法が含まれる(米国特許第4,743,548号、米国特許第4,795,855号、米国特許第5,068,193号、米国特許第5,188,958号、米国特許第5,463,174号、米国特許第5,565,346号および米国特許第5,565,347号を参照のこと)。便宜上、DNA配列または構築物を取込ませる任意の方法により操作されている宿主細胞を、本発明では、「形質転換(された)」または「組換え(体)」と称することにする。対象宿主は、少なくとも1コピーの発現構築物を有し、また、該遺伝子がゲノム内に組込まれるか、増幅されるか、または多コピー数を有する染色体外要素上に存在するかに応じて、2以上のコピーを有することが可能である。

形質転換された宿主細胞は、導入した構築物上に含まれるマーカーに関する選択により同定することができる。あるいは、多数の形質転換技術が宿主細胞内に多数のDNA分子を導入するため、分離したマーカー構築物を所望の構築物と共に導入することができる。典型的には、形質転換された宿主は、それが選択培地上で増殖する能力に関して選択される。選択培地は、抗生物質を含んでいたり、あるいは未形質転換宿主の増殖に必要な因子(例えば、栄養因子または増殖因子)

を欠いていてもよい。そのための導入マーカー遺伝子は、抗生物質耐性を付与し、あるいは必須の増殖因子または酵素をコードし、形質転換宿主内で発現された場合に選択培地上での増殖を可能にしうる。望ましくは、カナマイシンにおよびアミノグリコシドG418に対する耐性に関心が持たれる(米国特許第5,034,322号を参照のこと)。また、形質転換宿主の選択は、発現されたマーカータンパク質が直接的または間接的に検出可能な場合に行なうことができる。該マーカータンパク質は、単独で又は別のタンパク質との融合体として発現させることができる。該マーカータンパク質は、その酵素活性により検出することができ、例えば、 β ガラクトシダーゼは基質X-galを着色産物に変換することが可能であり、ルシフェラーゼはルシフェリンを発光性産物に変換することが可能である。該マーカータンパク質は、その光生成または修飾特性により検出することができ、例えば、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) のグリーン蛍光タンパク質は、青色光が照射されると蛍光を発する。該マーカータンパク質または分子タグ(例えば、関心のあるタンパク質上のもの)を検出するために、抗体を使用することができる。該マーカータンパク質またはタグを発現する細胞は、例えば、視覚的に、またはFACSまたは抗体を使用するパンニングなどの技術により選択することができる。

本発明の方法および組成物を用いて産生されるPUFAは、遊離脂肪酸として又はアシルグリセロール、リン脂質、硫脂質または糖脂質などの複合形態で、宿主植物の組織および/または植物部位において見出されることがあり、当技術分野で良く知られている種々の手段により宿主細胞から抽出することができる。そのような手段には、有機溶媒での抽出、音波処理、例えば二酸化炭素を使用する超臨界流体抽出、および圧搾などの物理的手段、またはそれらの組合せを含めることができる。特に関心が持たれるのは、ヘキサンまたはメタノールおよびクロロホルムでの抽出である。所望により、負に荷電した部分をプロトン化し、それにより有機層中への所望の産物の分配を増加させるために、水層を酸性化することができる。抽出後、窒素気流下での蒸発により有機層を除去することができる。該産物がコンジュゲート化形態で単離される場合には、該遊離脂肪酸または関心のあるそれほど複雑でないコンジュゲートを放出するために、該産物を酵素的また

は化学的に切断することができ、ついで所望の最終産物を得るために更なる操作に付すことができる。望ましくは、コンジュゲート化形態の脂肪酸を水酸化カリウムで切断する。

脂肪酸の精製

更なる精製が必要な場合には、標準的な方法を用いることができる。そのような方法には、抽出、尿素での処理、分別晶出、HPLC、分別蒸留、シリカゲルクロマトグラフィー、高速遠心分離もしくは蒸留、またはこれらの技術の組合せを含めることができる。酸またはアルケニル基などの反応性基の保護を、公知技術、例えばアルキル化またはヨウ素化により、任意の工程で行なうことができる。用いる方法には、メチルエステルを得るための脂肪酸のメチル化が含まれる。同様に、任意の工程で保護基を除去することができる。望ましくは、ARA、DHAおよびEPAを含有する画分の精製は、尿素での処理および／または分別蒸留により行われる。

脂肪酸の用途

本発明の脂肪酸には、いくつかの用途がある。本発明のDNAに基づくプローブは、関連分子の単離方法またはデサチュラーゼを発現する生物の検出方法において有用である。該DNAまたはオリゴヌクレオチドは、プローブとして使用される場合には、検出可能である必要がある。これは、通常、例えば修飾された残基の取込みにより内部部位に又は5'もしくは3'末端に標識を付けることにより達成される。そのような標識は、直接検出することができるものであってもよく、あるいは検出可能なように標識された二次分子に結合することが可能であり、あるいは未標識二次分子および検出可能なように標識された三次分子に結合することが可能であり、この方法は、許容できないレベルのバックグラウンドシグナルを伴うことなく満足に検出可能なシグナルを得るのに実用的である限り、拡張適用することができる。二次、三次または架橋系には、他の任意の分子（標識または他の抗体を含む）に対する抗体の使用を含めることが可能であり、あるいは互いに結合する任意の分子、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン/アビジン系を含め

ることが可能である。典型的には、検出可能な標識には、放射性同位体、化学的

または酵素的に光を生成または改変する分子、検出可能な反応産物を与える酵素、磁性分子、蛍光分子または結合に際して変化する蛍光または光放出特性を有する分子が含まれる。標識方法の具体例は、米国特許第5,011,770号に記載されている。あるいは、標的分子の結合は、標的に対するプローブの結合の際の溶解熱の変化を等温滴定熱量測定により測定することにより、あるいは表面上の該プローブまたは標的をコートしそれぞれ標的またはプローブの結合により生じる表面からの光の散乱の変化を検出することにより（例えば、BIAcore系で行なうことができる）、直接検出することができる。

組換え手段により産生する本発明のPUFAは、多種多様な領域において有用である。ヒトまたは動物を種々の形態のPUFAで補うと、添加したPUFAのレベルだけでなく、それらの下流代謝産物のレベルも増加しうる。例えば、固有の Δ^6 -デサチユラーゼ経路が個体において機能不全である場合、GLAによる治療は、GLAのレベルだけでなく、ARAやプロスタグランジンなどの下流産物（図1を参照されたい）のレベルも増加させうる。複合的な調節メカニズムは、種々のPUFAを組合せること又はPUFAの種々のコンジュゲートを加えることが、そのようなメカニズムを阻害、制御または抑制して個体において所望のレベルの特異的PUFAを得るために望ましいものとしうる。

開示している方法により製造したPUFAまたはその誘導体は、食物代用物または補充剤（特に、乳幼児用配合物）として、あるいは静脈内栄養補給を受けている患者のために、あるいは栄養失調を予防または治療するために使用することができる。EPAなどの特定の脂肪酸は、ヒトの母乳のPUFA組成をより良く再現するように乳幼児用配合物の組成を改変するために使用することができる。ヒトの母乳中の優勢なトリグリセリドは、1,3-ジ-オレオイル-2-パルミトイルであると報告されており、2-パルミトイルグリセリドは2-オレオイルまたは2-リネオイルグリセリドより良く吸収されると報告されている（米国特許第4,876,107号）。典型的には、ヒトの母乳は、DHAとして約0.15%～約0.36%、EPAとして約0.03%～約0.13%、ARAとして約0.30%～約0.88%、DGLAとして約0.22%～約0.67%、およびGLAを約0.27%～約1.04を含む脂肪酸プロフィールを有する。

乳幼児用配合物のGLA : DGLA : ARAの好適な比は、それぞれ約1 : 1 : 4~約1 : 1 : 1である。これらのPUFA比を与える油の量は、当業者により過度の実験を行うことなく決定することができる。また、動物の組織または乳の脂肪酸組成をヒトまたは動物の消費に一層好ましいものに改変するために、PUFAまたはそれを含有する宿主細胞を動物用食物補充剤として使用することができる。

栄養組成物

本発明はまた、栄養組成物を含む。そのような組成物は、本発明の目的においては、体内に摂取されると、(a)組織を養育もしくは構成し又はエネルギーを供給するよう機能し、および/または、(b)適当な栄養状態または代謝機能を維持し、回復し又は支持する、ヒトが消費する任意の食物または調製物（経腸的または非経口的消費のためのものを含む）を含む。

本発明の栄養組成物は、本発明に従い製造された少なくとも1つの油または酸を含み、固体または液体のいずれの形態であってもよい。また、該組成物は、個々の用途に望ましい量の食用の多量栄養素、ビタミンおよびミネラルを含むことが可能である。そのような成分の量は、該組成物が、特別な必要性、例えば、ある代謝状態（例えば、代謝障害）に伴う必要性を有する健常な乳幼児、小児または成人への使用が意図されるか否かに応じて異なるであろう。

該組成物に加えることができる多量栄養素には、例えば、食用脂肪、炭水化物およびタンパク質が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような食用脂肪には、例えば、ヤシ油、大豆油ならびにモノおよびジグリセリドが含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような炭水化物には、例えば、グルコース、食用ラクトースおよび加水分解デンプン（hydrolyzed starch）が含まれるが、これらに限定されるものではない。さらに、本発明の栄養組成物中で使用することができるタンパク質には、例えば、大豆タンパク質、電気透析されたホエイ、電気透析された脱脂乳、乳ホエイ、またはこれらのタンパク質の加水分解物が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ビタミンおよびミネラルに関しては、カルシウム、リン、カリウム、ナトリウム、塩化物、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、セレン、ヨウ素ならびに

ビタミンA、E、D、CおよびB複合体を、本発明の栄養組成物に加えることができる。また、そのような他のビタミンおよびミネラルも加えることができる。

本発明の栄養組成物中で使用する成分は、半精製物または精製物に由来する。半精製（物）または精製（物）は、天然物の精製により又は合成により調製された物質を意味する。

本発明の栄養組成物には、例えば、乳幼児用配合物、食物補充剤および再水和組成物が含まれるが、これらに限定されるものではない。特に関心が持たれる栄養組成物には、乳幼児に対する経腸的および非経口的な補充に使用するもの、専門的 (specialist) 乳幼児用配合物、中高年者に対する補充剤、および胃腸障害および／または吸収不良の者に対する補充剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。

栄養組成物

本発明の典型的な栄養組成物は、個々の用途に望ましい量の食用の多量栄養素、ビタミンおよびミネラルを含有する。そのような成分の量は、該配合物が、一時的にストレスにさらされた健常な個体への使用が意図されるのか、または或る慢性もしくは急性病態（例えば、代謝障害）による特別な必要性を有する被験者への使用が意図されるのかに応じて異なるであろう。本発明の栄養配合物に使用する成分は半精製物または精製物に由来する、と当業者には理解されるであろう。半精製（物）または精製（物）は、天然物の精製により又は合成により調製された物質を意味する。これらの技術は当技術分野で良く知られている（例えば、Code of Federal Regulations for Food Ingredients and Food Processing; Recommended Dietary Allowance, 第10版, National Academy Press, Washington, D.C., 1989を参照されたい）。

好ましい実施形態では、本発明の栄養配合物は、経腸栄養製品、より好ましくは、成人または小児用の経腸栄養製品である。したがって、本発明の更にもう1つの態様では、ストレスを受けている栄養補給される成人または子供に適した栄養配合物を提供する。該配合物は、本発明のPUFAに加えて、成人の1日栄養必要量を与えるよう意図された量の多量栄養素、ビタミンおよびミネラルを含む。

該多量栄養素成分には、食用脂肪、炭水化物およびタンパク質が含まれる。代表的な食用脂肪としては、ヤシ油、大豆油、およびモノおよびジグリセリド、および本発明のPUFA油が挙げられる。代表的な炭水化物には、グルコース、食用ラクトースおよび加水分解コーンスターチが挙げられる。典型的なタンパク質源は、大豆タンパク質、電気透析されたホエーまたは電気透析された脱脂乳または乳ホエー、またはこれらのタンパク質の加水分解物であるが、他のタンパク質源も入手可能であり、使用することができる。これらの多量栄養素は、ヒトの母乳中に存在するものと同等の量またはエネルギー基準、すなわち毎カロリー基準 (per calorie basis) の一般に許容される栄養化合物の形態で加える。

液状経腸栄養配合物を製剤化するための方法は、当技術分野で良く知られており、実施例に詳細に記載されている。

該経腸配合物を滅菌し、ついで、そのまま摂取できる状態 (ready-to-feed(RTF)) で使用したり、あるいは濃縮液または粉末として保存することができる。該粉末は、前記のとおり調製した経腸配合物を噴霧乾燥することにより調製することができ、該配合物は、該濃縮物を再水和させることにより再構成することができる。成人および乳幼児用の栄養配合物は、当技術分野で良く知られており、商業的に入手可能である (例えば、Ross Products Division, Abbott Laboratories の Similac®, Ensure®, Jevity®および Alimentum®)。本発明の油または酸は、後記の量で、これらの配合物のいずれかに加えることができる。

液体形態の該栄養組成物のエネルギー密度は、典型的には、約0.6Kcal~3Kcal/mlとなることが可能である。固体または粉末形態の場合には、該栄養補充剤は、約1.2~9Kcal/gm以上、好ましくは3~7Kcal/グラムを含有することが可能である。一般には、液状産物の浸透圧重量モル濃度は、700mOsm未満、より好ましくは660mOsm未満となるべきである。

該栄養配合物は、典型的には、本発明のPUFAに加えて、ビタミンおよびミネラルを含み、これらの物質の最少1日必要量を個体が摂取するのを補助するように意図されている。また、前記のPUFAに加えて、抗酸化剤の他に亜鉛、銅および葉酸を該栄養組成物に補充することが望ましいかもしれない。これらの物質はまた、ストレスを受けた免疫系に追加刺激を与え、それにより該個体に更なる利

点を与えると考えられる。免疫抑制に対する有益な効果を得るためには、亜鉛、銅または葉酸の存在は任意であり、必ずしも要求されるものではない。同様に、医薬組成物にも、これらの同じ物質を補充することができる。

より好ましい実施形態では、該栄養剤は、抗酸化系およびPUFA成分に加えて、炭水化物源を含有し、該炭水化物の少なくとも5重量%は、消化不良性オリゴ糖である。より一層好ましい実施形態では、該栄養組成物は更に、タンパク質、タウリンおよびカルニチンを含有する。

開示している方法により製造したPUFAまたはその誘導体は、代用食または補充剤（特に、乳幼児用配合物）として、あるいは静脈内栄養補給を受けている患者のために、あるいは栄養失調を予防または治療するために使用することができる。典型的には、ヒトの母乳は、DHAとして約0.15%～約0.36%、EPAとして約0.03%～約0.13%、ARAとして約0.30%～約0.88%、DGLAとして約0.22%～約0.67%、およびGLAを約0.27%～約1.04を含む脂肪酸プロフィールを有する。さらに、ヒトの母乳中の優勢なトリグリセリドは、1,3-ジ-オレオイル-2-パルミトイルであると報告されており、2-パルミトイルグリセリドは2-オレオイルまたは2-リネオイルグリセリドより良く吸収されると報告されている（米国特許第4,876,107号）。したがって、本発明により製造されるARA、DGLA、GLAおよび／またはEPAなどの脂肪酸は、ヒトの母乳のPUFA組成をより良く再現するように乳幼児用配合物の組成を改変するために使用することができる。特に、薬理学的または食用補充剤（特に、母乳代替物または補充剤）中に使用するための油組成物は、好ましくは、1以上のARA、DGLAおよびGLAを含む。より好ましくは、該油は、約0.3～30%のARA、約0.2～30%のDGLAおよび約0.2～約30%のGLAを含む。

濃度に加えて、ARA、DGLAおよびGLAの比率は、与えられた個々の最終用途に適合させることができる。ARA、DGLAおよびGLAの2以上を含有する油組成物は、母乳補充剤または代用物として製剤化される場合、それぞれ約1:19:30～約6:1:0.2の比で提供される。例えば、動物の母乳のARA:DGLA:DGLの比は、好ましくは約1:1:1、1:2:1、1:1:4の中間比を含む1:19:30～6:1:0.2の範囲の様々な比となりうる。宿主細胞内で一緒に産生される場合には、

PUFAの比を厳密に制御するために、GLAおよびDGLAなどの前駆体基質からARAへの変換の比率および割合を調節することができる。例えば、ARA対DGLAの比約1:19を得るためには、DGLAからARAへの変換比率5%~10%を用い、一方、ARA対DGLAの比約6:1を得るためには、変換比率約75%~80%を用いることができる。したがって、細胞培養系中であるか又は宿主動物中であるかにかかわらず、PUFAのレベルおよび比率をモジュレートするために、記載されているデサチュラーゼの発現の時期、程度および特異性の調節を行なうことができる。また、用いる発現系（例えば、細胞培養、または乳中に油を発現する動物）に応じて、該油を単離し、所望の濃度および比で組換えることができる。これらのPUFA比を与える油の量は、標準的なプロトコールに従い測定することができる。また、動物の組織または乳の脂肪酸組成をヒトまたは動物の消費に一層好ましいものに改変するために、PUFAまたはそれを含有する宿主細胞を動物用食物補充剤として使用することができる。

食物補充のためには、精製されたPUFAまたはその誘導体を、通常用途において摂取者が所望の量を摂取するように製剤化された調理用油、脂肪またはマーガリン中に加えることができる。また、該PUFAは、乳幼児用配合物、栄養補充剤または他の食品中に加えることができ、抗炎症剤およびコレステロール低下剤として有用かもしれない。

医薬組成物

本発明は、本明細書に記載した方法によって製造された1種またはそれ以上の酸及び／または生成される油を含む医薬組成物も包含する。より具体的には、このような医薬組成物は、1種またはそれ以上の酸及び／または油とともに、標準的な周知の無毒の医薬上許容される担体、補助剤、あるいは例えばリン酸緩衝食塩水、水、メタノール、ポリオール、植物性油、湿潤剤または水／油エマルジョン等のエマルジョンのようなビヒクルを含むものとすることができる。組成物は、液体あるいは固体の形態とすることができる。例えば、前記組成物は、錠剤、カプセル剤、経口摂取可能な液剤または粉末剤、注射可能なもの、あるいは局所塗布用の軟膏またはクリーム剤の剤形とすることができる。

可能な投与経路としては、例えば、経口、経直腸または非経口経路が含まれる。もちろん、投与経路は所望の効果に依存する。例えば、前記組成物が肌荒れ、乾燥皮膚、もしくは老化した皮膚の治療のため、損傷もしくは熱傷を受けた皮膚の治療のため、あるいは疾患に罹患したもしくは症状を有する皮膚もしくは頭髪の治療に用いられる場合には、前記組成物は局所的に適用されることになる。

患者に投与される前記組成物の用量は、当業者が決定することができ、例えば患者の体重、患者の年齢、患者の免疫状態等の種々の因子によって変わる。

前記組成物は、その形態については、例えば溶液、分散物、懸濁液、エマルジョン、または後に再構成される滅菌粉末とすることができる。

さらに本発明の組成物は化粧品用途にも用いることができる。前記組成物は、既存の化粧品組成物に加えて混合物を形成してもよく、あるいは単独の組成物として用いてもよい。

医薬組成物は、PUFA成分を個体に投与するために用いることができる。適当な医薬組成物は、生理学上許容される滅菌された水性または非水性溶液、分散物、懸濁物またはエマルジョン及び摂取用の滅菌溶液または分散物に再構成するための滅菌粉末を含むものとすることができる。適当な水性及び非水性担体、希釈剤、溶媒、またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール(プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロール等)、適当なそれらの混合物、植物油(例えばオリーブ油)及び例えばオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルが挙げられる。適当な流動性は、例えば分散物の場合には必要な粒径を維持し、また界面活性剤を使用することによって維持され得る。また糖、塩化ナトリウム等のような等張剤を含めることが望ましい場合もある。前記組成物は、このような不活性希釈剤の他に、例えば湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味料、着香剤及び芳香剤のような補助剤を含んでもよい。

懸濁物は、その活性成分に加えて、懸濁化剤、例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天及びトラガカントまたはこれらの物質の混合物等を含むものとすることができる。

錠剤及びカプセル剤のような固体剤形は、当分野において周知の技術を用いて

調製することができる。例えば、本発明のPUFAは、例えばラクトース、ショ糖、及びコーンスターチのような従来の錠剤基剤を、例えばアラビアゴム、コンスターチまたはゼラチンのような結合剤、例えばポテトスターチまたはアルギン酸のような崩壊剤、及び例えばステアリン酸またはステアリン酸マグネシウムのような滑剤と組み合わせたものにより錠剤化することができる。カプセル剤は、これらの賦形剤を酸化防止剤及びPUFA成分とともにゼラチンカプセルに封入することにより調製することができる。医薬製剤に混和されるべき酸化防止剤及びPUFA成分の量は、上記の指針の範囲内に収まるようにすべきである。

本明細書において使用される用語「治療」は、望ましくない状態の発症を防止しあるいは低減することをいう。例えば、免疫抑制を治療するということは、この抑制の発生を防止することか、あるいはこのような抑制の程度を小さくすることをいう。用語「患者」及び「個体」は互換可能に用いられ、両者ともに動物を示す。本明細書において用いる用語「動物」は、限定するものではないが、イヌ、ヒト、サル、及び類人猿を含む任意の温血動物をいう。本明細書において用いられる用語「約」は、使用の事情により記載した範囲または数値から合理的な量だけ変化する量をいう。本明細書において特定された数値または範囲はいずれも用語「約」によって変化し得るものと考えべきである。

「用量」及び「服用量」は、互換可能に用いられ、単回の設定において患者に摂取され、有効量の抗酸化剤及び構造化トリグリセリドが供給されるように設定された栄養組成物または医薬組成物の量をいう。当業者には明らかなように、液体栄養粉末の単回用量または服用量は、上記の量の抗酸化剤及びPUFAを与えるものとする。用量または服用量は、通常の成人が一度に消費できる量であるべきである。この量は、患者の年齢、体重、性別または医学的条件によって大きく変化する。しかし、一般的指針のように液体栄養剤の単回服用量または投与量は、100~600ml、より好ましくは125~500ml、最も好ましくは125~300mlの量を包含するものと考えべきである。

本発明のPUFAは食餌の補充が不要な場合でも食品に加えることができる。例えば、前記組成物を、限定するものではないが、マーガリン、加工バター、チーズ、ミルク、ヨーグルト、チョコレート、キャンディ、スナック類、サラダオイ

ル、調理用の油脂、肉類、魚、及び飲料を含む任意の種類の食品に加えることができる。

医薬的用途

医薬的使用（ヒトに対するまたは獣医学上の使用）のためには、前記組成物は一般に経口投与されるが、前記組成物がうまく吸収される任意の経路、例えば非経口（即ち皮下、筋肉内、または静脈内）、経直腸、経膈または例えば皮膚用軟膏またはローションのように局所的経路によっても投与することができる。本発明のPUFAは、単独で、あるいは医薬上許容される担体または賦形剤とともに投与することができる。ゼラチンカプセルは、それが使用可能な場合、好ましい経口投与用の剤形である。上記のような食物補充剤も、投与の経口経路を与え得る。本発明の不飽和酸は、コンジュゲート形態で、あるいは脂肪酸の塩、エステル、アミドまたはプロドラッグとして投与することができる。任意の医薬上許容される塩は本発明に包含され、特に好ましいのはナトリウム、カリウムまたはリチウム塩である。PCT公開WO96/33155に記載される例えばN-メチルグルカミンのようなN-アルキルポリヒドロキサミン塩も包含される。好適なエステルはエチルエステルである。固形の塩として、PUFAは錠剤の剤形で投与することもできる。静脈内投与のため、PUFAまたはその誘導体を、例えばIntralipidのような市販の配合物に含めることができる。典型的な正常な成人の血漿脂肪酸プロファイルは、6.64~9.46%のARA、1.45~3.11%のDGLA、及び0.02~0.08%のGLAを含む。これらのPUFAまたはそれらの代謝前駆体を、単独で、または他のPUFAと混合して投与することにより患者の正常な脂肪酸プロファイルを得ることができる。必要な場合は、1種類または複数の用途のために、配合物の個々の成分をキットの形態で個別に提供することができる。特定の脂肪酸の典型的な用量は、一日当たり0.1mg~20g、あるいは100g、好ましくは一日当たり10mgから必要に応じて1、2、5または10gであり、その誘導体形態の場合はそのモル等量である。トリグリセリドに換算して約2~約30重量%の脂肪酸を含む非経口栄養組成物が本発明に包含され、GLAとして約1~約25重量%の全PUFA組成を有する組成物が好ましい（米国特許第5,196,198号）。その他のビタミン、特に例えばビタミンA、

D、E及びL-カルニチンのような脂溶性ビタミンを所望に応じて含めることができる。必要な場合は、例えば α -トコフェロールのような保存剤を、典型的には約0.1重量%加えることができる。

適当な医薬組成物は、生理学的に許容される滅菌された水性または非水性溶液、分散物、懸濁物またはエマルジョン、及び滅菌された注射可能な溶液または分散物に再構成するための滅菌粉末を含み得る。適当な水性及び非水性担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール(プロピレングリオール、ポリエチレングリコール、グリセロール等)、それらの適当な混合物、植物油(例えばオリーブ油)及び例えばオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルが含まれる。適当な流動性は、例えば分散物の場合は必要な粒径を維持することにより、また界面活性剤を使用することにより維持することができる。また、例えば糖、塩化ナトリウム等のような等張剤を含めることも望ましい場合がある。このような不活性希釈剤の他に、前記組成物は、例えば湿潤剤、乳化剤及び懸濁物、甘味料、着香剤、及び芳香剤のような補助剤も含むものとすることができる。

懸濁物は、活性化合物に加えて、例えばエトキシシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天及びトラガカントまたはこれらの物質の混合物等のような懸濁化剤を含むものとすることができる。

特に好適な医薬組成物は、水性媒体または溶媒に溶解されたモノ及びジグリセリドのジアセチル酒石酸エステルを含む。モノ及びジグリセリドのジアセチル酒石酸エステルは、約9~12のHLB値を有し、2~4のHLB値を有する既存の抗菌剤脂質より有意に高い親水性を有する。これらの既存の疎水性脂質は、水性組成物に製剤化することができない。本明細書に開示するように、これらの脂質はモノ及びジグリセリドのジアセチル酒石酸エステルとともに水性媒体中に可溶化することができる。この態様では、モノ及びジグリセリドのジアセチル酒石酸エステル(例えばDATEM-C12:0)を、他の活性抗菌脂質(例えば18:2及び12:0モノグリセリド)に溶解し、混合し均質な混合物を得る。この均質性により抗菌活性を高めることができる。この混合物は、水に完全に分散することができる。これは、

モノ及びジグリセリドのジアセチル酒石酸エステルの添加、及び水に導入する前に他のモノグリセリドと予備混合することなしには不可能である。次いでこの水溶性組成物を、生理学上許容される希釈剤、保存剤、バッファー、またはスプレーまたは吸入剤を形成するために必要とされ得る噴霧剤と無菌状態で混合することができる。

また本発明は、脂肪酸による多くの疾患の治療を包含する。本発明のPUFAの補充を、血管形成術後の再狭窄を治療するために使用することができる。炎症、リウマチ性関節炎、及び喘息及び感染の症状を本発明のPUFAで治療することができる。PUFAがカルシウム代謝に関与し得ることが証明されており、これは本発明のPUFAを骨粗鬆症や腎及び尿道結石の治療に使用することができることを示唆している。

本発明のPUFAは癌の治療に用いることができる。悪性細胞は変化した脂肪酸組成を有することが示されており、脂肪酸を加えることによりその増殖を遅延させて細胞死をもたらし、またそれらの化学療法剤に対する感受性を高められることが分かってきた。GLAは癌細胞上でのE-カドヘリン細胞接着分子の再発現を引き起こすことが分かった。このE-カドヘリン細胞接着分子の欠損は、進行性の転移と関係する。GLAの水溶性リチウム塩の膵臓癌患者への静脈内投与の臨床試験の結果、統計的に有意な患者の生存率の上昇が見られた。PUFAの補充は、癌にともなうカヘキシーの治療にも有用であり得る。

本発明のPUFAは、糖尿病の治療のためにも用いることができる(米国特許第4,826,877号;Horrobinら, Am. J. Clin. Nutr. Vol. 57(Suppl.), 732S-737S)。脂肪酸代謝及び組成の変化が、糖尿病の動物において示されている。これらの変化は、網膜症、神経障害、腎障害及び生殖系の障害を含む糖尿病によって生じる長期の合併症のいくつかに関与することが示唆されている。サクラソウ油はGLAを含み、糖尿病による神経障害を予防し、逆転させることが示されている。

本発明のPUFAは、湿疹の治療、血圧の低下、及び数学的スコアの改善のために用いることができる。必須脂肪酸の欠乏は湿疹に関与することが示唆されており、研究の結果、GLAによる治療が湿疹に有効であることが判った。GLAはスト

レスに伴う血圧の上昇を低下させること、及び算術試験の成績を改善することも判った。GLA及びDGLAは血小板凝集を阻害し、血管拡張を引き起こし、コレステロール濃度を低下させ、また血管壁平滑筋及び繊維組織の増殖を阻害することが判っている(Brennerら, Adv. Exp. Med. Biol, Vol.83, p.85-101, 1976)。GLAまたはDGLAを単独で、あるいはEPAと組み合わせて投与することにより非ステロイド抗炎症剤によって生ずる消化管の出血及びその他の副作用が低下または防止されることが判っている(米国特許第4,666,701号)。GLA及びDGLAが、子宮内膜症及び月経前症候群を予防または治療し(米国特許第4,758,592号)、筋痛性脳脊髄炎及びウイルス感染の後の慢性疲労を治療する(米国特許第5,116,871号)ことも判っている。

本発明のPUFAのさらに別の使用としては、AIDS、多発性硬化症、急性呼吸症候群、高血圧症及び炎症性皮膚疾患の治療における使用が挙げられる。また本発明のPUFAは一般的健康並びに老人治療のための配合物に用いることもできる。

獣医学上の用途

上記の医薬及び栄養組成物は、ヒトでの使用のみならず動物についても用いることができ、これは動物もヒトと同様の多くの必要性及び症状を示すからである。例えば、本発明の油または酸を動物用食餌補充剤において、または動物用食餌代用物物に用いることができる。

以下の実施例は、例示として示すものであり、限定を意図するものではない。

実施例

実施例 1 Mortierella alpinaからの Δ 5-デサチュラーゼヌクレオチド配列の単離

実施例 2 Mortierella alpinaからの Δ 6-デサチュラーゼヌクレオチド配列の単離

実施例 3 Mortierella alpina Δ デサチュラーゼに相同な Δ 6デサチュラーゼの同定

実施例 4 Mortierella alpinaからのD-12デサチュラーゼ核酸配列の単離

実施例 5 Mortierella alpinaからのチトクロームb5還元酵素のヌクレオチド

配列の単離

実施例6 パン酵母におけるM. alpinaデサチュラーゼクローンの発現

実施例7 Ma29トランスジェニックナタネ (Brassica) 植物からの葉の脂肪酸
分析

実施例8 Brassica napusにおけるM. alpina Δ 6デサチュラーゼの発現

実施例9 Brassica napusにおけるM. alpina Δ 12デサチュラーゼの発現

実施例10 Brassica napusにおけるM. alpina Δ 6および Δ 12デサチュラーゼの
同時発現

実施例11 Brassica napusにおけるM. alpina Δ 5および Δ 6デサチュラーゼの
同時発現

実施例12 Brassica napusにおけるM. alpina Δ 5、 Δ 6および Δ 12デサチュラ
ーゼの同時発現

実施例13 Δ 6デサチュラーゼ油の立体特異性の分布

実施例14 トランスジェニック植物の脂肪酸組成

実施例15 交雑により達成される、B. napusにおける Δ 6および Δ 12デサチュ
ラーゼの組み合わせ発現

実施例16 大豆におけるM. alpinaデサチュラーゼの発現

実施例17 ヒトデサチュラーゼ遺伝子の配列

実施例1Mortierella alpinaからの Δ 5-デサチュラーゼヌクレオチド配列の単離

Mortierella alpinaは、 Δ 5-デサチュラーゼにより前駆体20:3からアラキドン酸(ARA、20:4)を生成する。Mortierella alpinaを起源とする Δ 5-デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列は、M. alpina第1鎖cDNA及びSynechocystis及びSpirulinaを起源とする Δ 6-デサチュラーゼ間で保存されたアミノ酸配列に対応する縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅により得た。使用した手順は以下の通りである。

Hogeら、(1982) Experimental Mycology 6:225-232のプロトコルを用いて、

日目のMortierella alpinaのPUFA産生培地から全RNAを単離した。このRNAを用い、BRLのlambda-ZipLoxsystemをその使用説明書に従って使用して二本鎖cDNAを調製した。M. alpina cDNAの幾つかのサイズの分画を個別にパッケージして、異なるインサートの平均サイズを有するライブラリー群を作製した。「完全長」ライブラリーは、平均インサートサイズが1.77kbの約 3×10^6 個のクローンを含む。「シーケンシング級」ライブラリーは、平均インサートサイズが1.1kbの約 6×10^5 個のクローンを含む。

5 μ gの全RNAを、BRL Superscript RTase及びプライマーTSyn (5'-CAAGCTTCTG CAGGAGCTCTTTTTTTTTTTTTT-3') (配列番号19)を用いて逆転写した。縮重オリゴヌクレオチドを、二種の青緑色細菌 Δ 6-デサチュラーゼ配列の間で保存された領域に対して設計した。使用した具体的なプライマーは、D6DESAT-F3(配列番号20) (5'-CUACUACUACUACAYCAYACOTAYACOAAYAT-3')及びD6DESAT-R3(配列番号21) (5'-CAUCAUCAUOGGAAOARRTGRTG-3')であり、ここでY=C+T、R=A+G、及びO=I+Cである。40ngの全RNAに由来するテンプレート、2 pMの各プライマー、200 μ Mの各デオキシリボヌクレオチド三リン酸、60mMのTris-Cl, pH8.5、15mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 mMの MgCl_2 を含む25 μ l容量中でPCR増幅を行った。サンプルを95度(全ての温度は摂氏である)で5分間の最初の変性処理にかけた後、72度に保持し、0.2UのTaqポリメラーゼを添加した。PCR熱サイクル条件は、94度で1分間、45度で1.5分間、72度で2分間とした。PCRは35サイクル行った。M. alpinaの第1鎖cDNAに対してこれらのプライマーを用いたPCRにより550bpの反応生成物が生成された。M. alpinaのPCR断片の推定アミノ酸配列の比較により、 Δ 6-デサチュラーゼと相同な領域が判明した(図4参照)。しかし、比較した領域では、配列同一性は約28%に過ぎなかった。この推定アミノ酸は配列番号14に示される。

このPCR産物をプローブとして用いて、M. alpinaライブラリーから対応するcDNAクローンを単離した。最も長いcDNAクローンMa29をpCGN5521と命名し、両鎖について完全に配列決定した。このcDNAは、ベクターpZL1(Bethesda Research Laboratories)に最初のATGから始まる1481bpのインサートとして含まれ、446個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを含む。こ

のリーディングフレームはPCR断片から推定された配列を含む。このcDNAインサートの配列は、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼに相同な領域を含んでいることが判った(図8参照)。例えば、3つの保存的な「ヒスチジンボックス」(他の膜結合デサチュラーゼにおいて観察されている(Okuleyら, (1994) The Plant Cell 6:147-158))がMortierella配列のアミノ酸位置171~175、207~212及び387~391に存在していることが判った(図5A~5D参照)。しかし、Mortierellaデサチュラーゼの第3のヒスチジンボックスについて典型的な"HXXHW"アミノ酸モチーフは、QXXHHであることが判った。コードされたタンパク質のアミノ末端はチトクロームb5タンパク質に有意な相同性を示した。従って、Mortierella cDNAクローンは、チトクロームb5と脂肪酸デサチュラーゼとの融合物を示すものであると考えられる。チトクロームb5は膜結合デサチュラーゼ酵素に対する電子供与体として機能していると考えられることから、このデサチュラーゼタンパク質のN末端チトクロームb5ドメインは、その機能に関与している可能性がある。このことは、PUFA産生のための異種系においてデサチュラーゼを発現する場合に有益であり得る。

実施例 2

Mortierella alpinaからの $\Delta 6$ デサチュラーゼヌクレオチド配列の単離

実施例1に記載したM. alpina cDNAシーケンシング級ライブラリーからのクローンのランダムな配列決定により、Mortierella alpina由来の $\Delta 6$ 脂肪酸デサチュラーゼをコードする部分的なcDNAクローン、Ma524由来の核酸配列を得た。cDNA含有プラスミドは以下のように切り出した。

ECLB+カナマイシン($100\mu\text{g/ml}$)、0.2%マルトース、および10mM MgSO_4 中で培養して37℃にて15分間インキュベートした大腸菌DH10B (ZIP) $100\mu\text{l}$ をファージ $5\mu\text{l}$ に加えた。SOC (0.9ml)を加え、直ちに細菌($100\mu\text{l}$)を10個のECLB+ $50\mu\text{g}$ Penプレートの各々に載せた。45分間の回復時間は必要としなかった。これらのプレートを一晩37℃にてインキュベートした。コロニーを取り出してECLB+ $50\mu\text{g}$ Pen培地中に入れ、一晩培養して、グリセロールストックおよびminiprep DNAを作製するために使用した。ECLB+ $50\mu\text{g}$ Pen/ml上に載せる

と、 $100\mu\text{g/ml}$ Penに載せたときよりも、より多くのコロニーができ、インサー

トを含むコロニーの割合が増えた。

ランダムにコロニーを取り出し、Qiagen miniprepキットを用いてプラスミドDNAを精製した。cDNAインサートの5'末端からDNA配列を得て、BLASTアルゴリズムを用いてデータベースと比較した。Ma524は、以前同定された $\Delta 6$ デサチュラーゼと相同なDNA配列に基づいて推定 $\Delta 6$ デサチュラーゼとして同定された。M. alpinaライブラリーから全長cDNAクローンを単離した。このクローンの発生量はMa29よりもわずかに(2×)少ないと思われる。Ma524はCaenorhabditis elegansコスミド、W06D2.4、ヒマワリ由来のチトクロームd5/デサチュラーゼ融合タンパク質、および公共データバンクの2つの $\Delta 6$ デサチュラーゼ (SynechocystisおよびSpirulina由来のもの) の一部に有意な相同性を示す。

さらに、Ma524はルリチシャ $\Delta 6$ -デサチュラーゼの配列 (PCT公開W096/21022) に有意な相同性を示す。したがって、Ma524はルリチシャおよび藻の $\Delta 6$ -デサチュラーゼに関連する $\Delta 6$ -デサチュラーゼをコードすると思われる。Ma524およびルリチシャ $\Delta 6$ のアミノ酸配列は類似しているが、cDNAの塩基組成はずいぶん異なる。ルリチシャcDNAは全塩基組成の60%がA+Tであり、幾つかの部分ではA+Tが70%を超えるが、Ma524の平均A+T塩基組成は44%であり、60%を超える領域はない。これは、異なる塩基組成を好む微生物または動物におけるcDNAの発現を示唆するものであるかもしれない。組換え遺伝子の発現の乏しい発現は、宿主が、導入遺伝子とは非常に異なる塩基組成を有する場合に起こり得る。このような乏しい発現のための推測されるメカニズムは、mRNAの安定性または翻訳可能性の低下を含む。

実施例 3

Mortierella alpina $\Delta 6$ -デサチュラーゼに相同な $\Delta 6$ -デサチュラーゼの同定

Ma524アミノ酸配列を用いて、NCBIによるestデータベースのBLASTX検索により、推定 $\Delta 6$ -デサチュラーゼをコードする核酸配列を同定した。幾つかの配列は、有意な相同性を示した。特に、2つのArabidopsis thaliana配列の推定アミノ酸配列 (受託番号F13728およびT42806) は、Ma524の推定アミノ酸配列の

2つの異なる領域に対して相同性を示した。以下のPCRプライマーを設計した：

ATTS4723-FOR (F13728に相補的) 5'-CUACUACUACUAGGAGTCCTCTACGGTGTTTTG (配列番号22) およびT42806-REV (T42806に相同的) 5'-CAUCAUCAUATGATGCTCAAGCTGAACTG (配列番号23)。BRL Superscript RTアーゼおよびプライマーTSyn 5'-CCAA GCTTCTGCAGGAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (配列番号24) を用いて、*Arabidopsis thaliana*の発生長角果から単離した全長RNA 5 μ gを逆転写した。25ngの全長RNAから得たテンプレート、各々2 μ Mのプライマー、各々200 μ Mのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、60mM Tris-Cl, pH8.5, 15mM(NH₄)₂SO₄, 2mM MgCl₂, 0.2U Taqポリメラーゼを含む50 μ l容量中で、PCRを行った。サイクル条件は以下の通りであった: 94℃にて30秒、50℃にて30秒、72℃にて30秒。PCRを35サイクル続けたあと、72℃にて7分間さらに伸長を行った。PCRにより約750塩基対からなる断片が得られ、つぎにこれをサブクローン化して12-5と名づけ、配列決定した。この断片の各端部は、そのPCRプライマーが得られた*Arabidopsis est*に対応する。これは、12-5と呼ばれる配列である。12-5の推定アミノ酸配列を、Ma524のもの、およびヒト(W28140)、マウス(W53753)、および*C. elegans*(R05219)からのestと比較する(図4)。相同性に基づき、これらの配列はデサチュラーゼポリペプチドを表わす。この全長遺伝子は、該est配列に基づくプローブを用いてクローン化することができる。つぎに、この遺伝子を発現ベクターの中に配置して宿主細胞中で発現させることができ、これらの特定の Δ^6 -または他のデサチュラーゼ活性を以下のように決定することができる。

実施例 4

Mortierella alpinaからの Δ^6 -12デサチュラーゼヌクレオチド配列の単離

それが蓄積する脂肪酸に基づき、*Mortierella alpina*は ω^6 -型デサチュラーゼを有する。 ω^6 デサチュラーゼはオレイン酸(18:1)からのリノール酸(18:2)の生成に関与する。リノール酸(18:2)は、 Δ^6 デサチュラーゼのための基質である。この実験は、*Mortierella alpina*が Δ^6 -12デサチュラーゼポリペプチドを有するかどうかを決定し、もし有するのであれば、対応するヌクレオ

チド配列を同定するために設計される。*M. alpina*シーケンシング級ライブラリーからランダムに選んだコロニー、Ma648を配列決定し、以前に同定され

たデサチュラーゼと相同なDNA配列に基づいて推定デサチュラーゼとして同定した(Ma524について記載のとおり(実施例2を参照のこと))。Ma648 cDNAの5'末端から得たこの推定アミノ酸配列は、大豆ミクロソーム ω^6 ($\Delta 12$) デサチュラーゼ(受託番号L43921) およびピマの実のオレイン酸12-ヒドロキシラーゼ(受託番号U22378) に対して有意な相同性を示す。さらに、種々の他の ω^6 ($\Delta 12$) および ω^3 ($\Delta 15$) 脂肪酸デサチュラーゼ配列に対する相同性を観察する。

実施例 5

Mortierella alpinaからのチトクロームb5還元酵素ヌクレオチド配列の単離

Mortierella alpinaからチトクロームb5還元酵素をコードする核酸配列を以下のようにして得た。実施例1に記載したように、Mortierella alpinaから単離した全長RNAに基づいてcDNAライブラリーを構築した。これらのクローンのうちの1つ、M12-27の5'末端および3'末端からDNA配列を得た。M12-27の3'末端の推定アミノ酸配列を用いて公共データバンクの検索を行ったところ(図5を参照のこと)、既知のチトクロームb5還元酵素の配列に対して有意な相同性を示した。特に、49アミノ酸領域にわたり、Mortierellaクローンは、ブタ由来のチトクロームb5還元酵素と55%の同一性(73%の相同性)を共有する(図4参照)。

実施例 6

パン酵母におけるM. alpinaデサチュラーゼクローンの発現

酵母の形質転換

酵母の酢酸リチウム形質転換は、標準的なプロトコル(Methods in Enzymology, Vol. 194, p. 186-187, 1991)に従って行った。概略を述べると、まず酵母をYPDにおいて30℃で増殖させた。細胞を遠心分離により沈殿させ、TEに再懸濁し、再度遠心分離により沈殿させ、100mMの酢酸リチウムを含むTEに再懸濁し、

再度遠心分離により沈殿させ、さらにTE/酢酸リチウムに再懸濁した。再懸濁した酵母を、30℃で60分間震盪培養した。キャリアDNAを加え、酵母を試験管に一定分量に分けた。形質転換DNAを加え、試験管を30℃で30分間インキュベートした。PEG溶液(35%(w/v)PEG4000、100mM酢酸リチウム、TE pH7.5)を加え、その後30℃で50分間インキュベートした。42℃で5分間の熱ショックを行い、細胞をペ

レット化し、TEで洗浄し、再度ペレット化しTEに再懸濁した。次に再懸濁された細胞を選択培地上にプレート化した。

形質転換された酵母におけるデサチュラーゼの発現

*Mortierella alpina*を起源とするcDNAクローンをパン酵母におけるデサチュラーゼ活性についてスクリーニングした。アブラナ $\Delta 15$ -デサチュラーゼ(刊行物に記載された配列(Arondelら Science 258:1353-1355)に基づくプライマーを用いて、*Brassica napus*品種212/88種子からの第1鎖cDNAを用いたPCRにより得られたもの)を陽性対照として用いた。 $\Delta 15$ -デサチュラーゼ遺伝子とcDNAクローンMa29からの遺伝子を発現ベクターpYES2(Invitrogen)に挿入し、プラスミドpCGR-2及びpCGR-4をそれぞれ得た。これらのプラスミドを*S. cerevisiae*酵母株334にトランスフェクトし、特異的デサチュラーゼ活性の検出を可能にする基質の存在下で、ガラクトースによる誘導の後に発現させた。対照株は変更していないpYES2ベクターを含む*S. cerevisiae*株334とした。使用した基質、産生された生成物、及び示されたデサチュラーゼ活性は、DGLA(ARAへの変換が $\Delta 5$ -デサチュラーゼ活性を示す)、リノレン酸(GLAの変換が $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性を示し、ALAの変換が $\Delta 15$ -デサチュラーゼ活性を示す)、オレイン酸(*S. cerevisiae*によって生成される内在基質、リノレン酸への変換が $\Delta 12$ -デサチュラーゼ活性を示し、*S. cerevisiae*はこれを欠いている)、またはARA(EPAへの変換が $\Delta 17$ -デサチュラーゼ活性を示す)であった。結果を以下の表1に示す。脂質分画は以下のように抽出した。培養物を15℃で48~52時間増殖させた。細胞を遠心分離によりペレット化し、滅菌ddH₂Oで一回洗浄し、再度ペレット化した。このペレットをメタノールとともに攪拌し、クロロホルムを(内部標準としての)トリトリデカノインとともに加えた。混合物を室温で1時間以上、あるいは4℃

で一晩インキュベートした。クロロホルム層を抽出し、1 gの無水硫酸ナトリウムとともにWhatmanフィルターを通して濾過し、粒子及び残留水を除去した。窒素流下40℃で有機溶媒を蒸発させた。次に抽出された脂質を、2 mlのメタノール中の0.5 N水酸化カリウムを密閉管に加えることにより、ガスクロマトグラフィー分析(GC)用の脂肪酸メチルエステル(FAME)に誘導化した。サンプルを30分間

95~100℃に加熱し、室温まで冷却した。約2 mlのメタノール中の14%三フッ化ホウ素を加え、加熱処理を繰り返した。抽出された脂質混合物を冷却した後、2 mlの水及び1 mlのヘキサンを加え、GCによる分析用のFAMEを抽出した。パーセントへの変換は、産生された生成物を、(産生された生成物及び加えた基質の)合計で除し、100を乗ずることによって計算した。オレイン酸パーセント変換を計算するためには、基質が加えられないので、生成されたりノレン酸の総量を、(産生されたオレイン酸とリノレン酸の)合計で除し100を乗ずる。

表1

パン酵母における *M. alpina* デサチュラーゼの発現

クローン	酵素活性の種類	基質の%変換
pCGR-2 (カノラ $\Delta 15$ デサチュラーゼ)	$\Delta 6$	0 (18:2 から 18:3 $\omega 6$)
	$\Delta 15$	16.3 (18:2 から 18:3 $\omega 3$)
	$\Delta 5$	2.0 (20:3 から 20:4 $\omega 6$)
	$\Delta 17$	2.8 (20:4 から 20:5 $\omega 3$)
	$\Delta 12$	1.8 (18:1 から 18:2 $\omega 6$)
pCGR-4 (<i>M. alpina</i> $\Delta 6$ -様、 Ma29)	$\Delta 6$	0
	$\Delta 15$	0
	$\Delta 5$	15.3
	$\Delta 17$	0.3
	$\Delta 12$	3.3
pCGR-7 (<i>M. alpina</i> $\Delta 12$ -様、 Ma648)	$\Delta 6$	0
	$\Delta 15$	3.8
	$\Delta 5$	2.2
	$\Delta 17$	0
	$\Delta 12$	63.4

$\Delta 15$ -デサチュラーゼ対照クローンは16.3%の基質の変換を示した。Ma29 cDNAを発現するpCGR-4クローンは、15.3%の20:3基質を20:4 $\omega 6$ に変換し、これは該遺伝子が $\Delta 5$ -デサチュラーゼをコードすることを示す。バックグラウンド(基質の非特異的変換)は、これらの場合では0~3%であった。Ma524 cDNAを発現するpCGR-5クローンは、6%の基質のGLAへの変換を示し、これは、該遺伝子が $\Delta 6$ -デサチュラーゼをコードすることを示している。Ma648 cDNAを発現するpCGR-7クローンは

は、63.4%の基質のLAへの変換を示し、これは、該遺伝子が $\Delta 12$ -デサチュラーゼをコードすることを示している。また、我々は異なる濃度の基質を用いることによって活性の基質阻害を見出した。基質を $100\mu\text{M}$ まで加えた場合、基質を $25\mu\text{M}$ まで加えた場合と比較して生成物へのパーセント変換が低下した(下記参照)。これらのデータは、異種系において異なる基質特異性を有するデサチュラーゼが発現され得、PUFAを生成するのに用いることができるということを示している。

表2に、表示したプラスミドによって酵母宿主 *S. cerevisiae* 334から抽出された脂質の総量のパーセントとして対象の脂肪酸を示す。増殖培地にはグルコースは存在していなかった。アフィニティーガスクロマトグラフィーを用いて各脂質を分離した。GC/MSを用いて生成物の種類を確認した。 *B. napus* $\Delta 15$ -デサチュラーゼについて予測される生成物である α -リノレン酸は、その基質であるリノール酸を誘導酵母培地に外部から加えたときに検出された。この知見は、デサチュラーゼ遺伝子の酵母での発現によって、その場合の増殖条件下で機能的酵素及び検出可能な量の生成物が産生することができることを示している。この外部から添加された両基質は酵母に取り込まれるが、何れかを誘導酵母培地に遊離形態で加えると、より長い鎖のPUFA、ジホモ- γ -リノレン酸(20:3)が酵母に組込まれる量はリノール酸(18:2)より僅かに少ない。*S. cerevisiae* 334(pCGR-5)の誘導および発現の際にリノール酸が存在する場合は、 γ -リノレン酸が検出された。このPUFAの存在は、pCGR-5(MA524)からの $\Delta 6$ デサチュラーゼ活性を示す。リノール酸 (*S. Cerevisiae* 334(pCGR-7)の発現から抽出された脂質において同定された) は、*M. alpina*を起源とするcDNA MA648を $\Delta 12$ -デサチュラーゼと

して分類する。

表 2

酵母から抽出された全脂質のパーセンテージで表した脂肪酸の量

酵母中のプラスミド (酵素)	18:2 導入	α - 18:3 産生	γ - 18:3 産生	20:3 導入	20:4 産生	18:1* 存在	18:2 産生
pYES2 (対照)	66.9	0	0	58.4	0	4	0
pCGR-2 ($\Delta 15$)	60.1	5.7	0	50.4	0	0.7	0
pCGR-4 ($\Delta 5$)	67	0	0	32.3	5.8	0.8	0
pCGR-5 ($\Delta 6$)	62.4	0	4.0	49.9	0	2.4	0
pCGR-7 ($\Delta 12$)	65.6	0	0	45.7	0	7.1	12.2

100 μ M の基質を添加

*18:1 は酵母中の内在脂肪酸

表の凡例

18:1 =オレイン酸

18:2 =リノール酸

 α -18:3= α -リノレン酸 γ -18:3= γ -リノレン酸

18:4 =ステアリドン酸

20:3 =ジホモ- γ -リノレン酸

20:4 =アラキドン酸

実施例 7植物における $\Delta 5$ デサチュラーゼの発現葉における発現

この実験は、(ノーザンによる決定で) Ma29を発現する葉が外因的に適用されたDGLA (20:3) をARA (20:4) に変換することができるかどうかを決定するために設計された。

Ma29デサチュラーゼcDNAをPCRにより改変し、クローン化に都合のよい制限部位を導入した。デサチュラーゼ・コーディング領域は、アブラナ属植物 (Brassi

ca) の葉における発現のための二重³⁵Sプロモーターの制御の下でd35カセット (pCGN5525) に、標準プロトコル (USPN 5,424,200及びUSPN 5,106,739を参照) に従って挿入されている。pCGN5525を含むトランスジェニックアブラナ属植物を標準プロトコルに従って産生させた (USPN 5,188,958及びUSPN 5,463,174を参照)。

最初の実験においては、3種類の植物を用いた：対照LP004-1、並びに2種類のトランスジェニック体、5525-23及び5525-29。LP004は低リノレン・アブラナ属変種である。各々の葉を3種類の処理のうちの1つのために選択した：水、GLA又はDGLA。GLA及びDGLAはナトリウム塩としてNuChek Prepから購入し、1 mg/mlで水に溶解した。一定分量をN₂の下で覆い、-70℃で保存した。50 μ lの液滴を上面に適用し、手袋を着用した指で穏やかに広げて全面を覆うことにより葉を試験した。塗布は、塗布した脂肪酸のあらゆる光酸化を最小限に止めるため、光サイクルの最後の約30分前に行った。処理の6日後に、各々の処理から1枚の葉を回収し、中央脈を経て半分に切断した。半分的一方は水で洗浄し、取り込まれない脂肪酸の除去を試みた。葉のサンプルを一晩凍結乾燥し、脂肪酸の組成をガスクロマトグラフィー (GC) で決定した。それらの結果を表3に示す。

表3
Ma29トランスジェニックアブラナ属植物由来の葉の脂肪酸分析

処理	SPL	16:00	16:01	18:00	18:01	18:10	18:1v	18:02	18:3g	18:03	18:04	20:00	20:01
	#	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
水	33	12.95	0.08	2.63	2.51	1.54	0.98	16.76	0	45.52	0	0.09	0
	34	13.00	0.09	2.67	2.56	1.55	1.00	16.86	0	44.59	0	0.15	0
	35	14.13	0.09	2.37	2.15	1.27	0.87	16.71	0	49.91	0	0.05	0.01
	36	13.92	0.08	2.32	2.07	1.21	0.86	16.16	0	50.25	0	0.05	0
GLA	37	13.79	0.11	2.10	2.12	1.26	0.86	15.90	0.08	46.29	0	0.54	0.01
	38	12.80	0.09	1.94	2.08	1.35	0.73	14.54	0.11	45.61	0	0.49	0.01
	39	12.10	0.09	2.37	2.10	1.29	0.82	14.85	1.63	43.66	0	0.53	0
	40	12.78	0.10	2.34	2.22	1.36	0.86	15.29	1.72	47.22	0	0.50	0.02
	41	13.71	0.07	2.68	2.16	1.34	0.82	15.92	2.12	46.55	0	0.09	0
	42	14.10	0.07	2.75	2.35	1.51	0.84	16.66	1.56	46.41	0	0.09	0.01
	43	13.62	0.09	2.22	1.94	1.21	0.73	14.68	2.42	46.69	0	0.51	0.01
	44	13.92	0.09	2.20	2.17	1.32	0.85	15.22	2.30	46.05	0	0.53	0.02
DGLA	45	12.45	0.14	2.30	2.28	1.37	0.91	15.65	0.07	44.62	0	0.12	0.01
	46	12.67	0.15	2.69	2.50	1.58	0.92	15.96	0.09	42.77	0	0.56	0.01
	47	12.56	0.23	3.40	1.98	1.13	0.86	13.57	0.03	45.52	0	0.51	0.01
	48	13.07	0.24	3.60	2.51	1.63	0.88	13.54	0.04	45.13	0	0.50	0.01
	49	13.26	0.07	2.81	2.34	1.67	0.67	16.04	0.04	43.89	0	0.59	0
	50	13.53	0.07	2.84	2.41	1.70	0.70	16.07	0.02	44.90	0	0.60	0.01

表3
Ma29トランスジェニックアブラナ属植物由来の葉の脂肪酸分析

処理	SPL #	20:02 %	20:03 %	20:04 %	20:05 %	22:00 %	22:01 %	22:02 %	22:03 %	22:06 %	24:0 %	24:1 %
水	33	0	0	0.29	0	0.01	0.09	16.26	0	0	0.38	0.18
	34	0.01	0	0.26	0	0.14	0.10	16.82	0.02	0.05	0.36	0.27
	35	0.01	0	0.25	0	0.12	0.06	11.29	0.04	0.05	0.29	0.23
	36	0	0.01	0.26	0	0.07	0.04	11.82	0.03	0.36	0.28	0.21
GLA	37	0.02	0	0.21	0	0.18	0.08	15.87	0.06	0.20	0.30	0.17
	38	0.01	0	0.24	0	0.15	0.07	13.64	0.09	0.08	0.39	0.23
	39	0.02	0.01	0.27	0	0.10	0.08	16.25	3.42	0.19	0.37	0.17
	40	0.01	0	0.27	0	0.10	0.10	14.74	0.05	0.10	0.36	0.14
DGLA	41	0	0	0.27	0	0.20	0.10	13.15	0.13	0.29	0.33	0.20
	42	0	0	0.28	0	0.11	0.11	12.60	0.02	0.24	0.38	0.13
	43	0.01	0	0.28	0	0.10	0.03	14.73	0.01	0.24	0.34	0.14
	44	0.02	0	0.26	0	0.13	0.07	14.43	0.05	0.16	0.33	0.17
	45	0.06	1.21	0.26	0	0.07	0.07	18.67	0.02	0.21	0.36	0.13
	46	0	1.94	0.27	0	0.11	0.09	17.97	0.09	0.39	0.41	0.11
	47	0.01	0.69	0.96	0	0.11	0.07	17.96	0	0.22	0.49	0.20
	48	0.01	0.70	0.74	0	0.14	0.09	17.14	0.05	0.32	0.52	0.10
	49	0	0.35	1.11	0	0.10	0.07	17.26	0.07	0.23	0.39	0.18
	50	0	0.20	0.87	0	0.21	0.07	15.73	0.04	0.15	0.37	0.18

GLAで処理した葉は1.56~2.4重量%のGLAを含んでいた。脂肪酸分析では、対照とトランスジェニック葉との脂質組成が本質的に同じであることが示された。DGLAで処理した対照植物の葉は1.2~1.9重量%のDGLA及びバックグランド量のARA(.26~.27重量%)を含んでいた。トランスジェニック葉は僅かに.2~.7重量%のDGLAを含むだけであったが、ARAの量は増加しており(.74~1.1重量%)、これらの葉においてDGLAがARAに変換されたことが示された。

種子における発現

この実験の目的は、種子特異的ナピン (napin) プロモーターを含む構築体が種子において発現可能であるかどうかを決定することであった。

Ma29 cDNAを、以下のプライマー：

Madxho—順方向：

5'—CUACUACUACUACTCGAGCAAGATGGGAACGGACCAAGG

(配列番号25)

Madxho—逆方向：

5'—CAUCAUCAUCAUCTCGAGCTACTCTTCCTTGGGACGGAG

(配列番号26)

を用いてPCRによって改変し、それぞれ、開始及び終止コドンの上流及び下流にXhoIクローニング部位を導入した。

このPCR産物をpAMP1 (GIBCOBRL) にCloneAmpシステム (GIBCOBRL) を用いてサブクローン化してpCGN5522を作製し、両鎖の配列決定を行うことにより $\Delta 5$ デサチュラーゼ配列を確認した。

種子特異的発現のため、Ma29コーディング領域をpCGN5522からXhoI断片として切り出し、ナピン発現カセットpCGN3223のSalI部位に挿入してpCGN5528を作製した。ナピン5' 調節領域、Ma29コーディング領域、及びナピン3' 調節領域を含むpCGN5528のHindIII断片をpCGN1557のHindIII部位に挿入し、pCGN5531を作製した。2コピーのナピン転写単位を縦列状態で (in tandem) 挿入した。この縦列構築体は、遺伝子座当たりデサチュラーゼを高発現させること

ができる。pCGN5531をアブラナ (*Brassica napus*) cv.LP004にアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 仲介形質転換により導入した。

成熟T2種子の20種子のプールの脂肪酸組成をGCで分析した。表4は、独立した形質転換系で得られた結果を非形質転換LP004種子と比較して示す。pCGN5531を含むトランスジェニック種子は対照種子には存在しない2種類の脂肪酸を含み、これらはオレイン酸及びリノール酸に対するそれらの溶出に基づいて仮にタキソール酸 (taxoleic acid) (5,9-18:2) 及びピノレン酸 (pinolenic acid) (5

,9,12-18:3) と同定された。これらは、オレイン酸及びリノール酸の $\Delta 5$ 不飽和化の予想産物である。これらのトランスジェニック種子では、他の脂肪酸組成に違いは認められなかった。

表4
T2ブール種子の組成

	16:0	16:1	18:0	18:1	(5:9)18:2	18:2	(5,9,12)18:3	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	24:0
LP004 対照	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
5531-1	3.86	0.15	3.05	69.1	0	18.51	0.01	1.65	1.09	1.40	0.03	0.63	0.05	0.42
5531-2	4.26	0.15	3.23	62.33	4.07	21.44	0.33	1.38	0.91	1.04	0.05	0.41	0.03	0.27
5531-6	3.78	0.14	3.37	66.18	4.57	17.31	0.27	1.30	1.03	1.18	0	0.47	0.01	0.30
5531-10	3.78	0.13	3.47	63.61	6.21	17.97	0.38	1.34	1.04	1.14	0.05	0.49	0.02	0.26
5531-16	3.96	0.17	3.28	63.82	5.41	18.58	0.32	1.43	0.98	1.11	0.02	0.50	0	0.31
5531-28	3.91	0.17	3.33	64.31	5.03	18.98	0.33	1.39	0.96	1.11	0	0.44	0	0
	3.81	0.13	2.58	62.64	5.36	20.95	0.45	1.39	0.83	1.15	0.01	0.36	0.05	0.21

Ma29を発現するものを同定するため、ノーザン分析を植物に対して行なう。開花の約25日後又はナピンプロモーターが誘発されたときに発生胚を単離し、実施例7に記載されるようにGLA又はDGLAを含む溶液に浮かべる。次に、実施例7にお

いて葉に適用したプロトコルに従い、胚の脂肪酸分析をGCにより行ってDGLAからARAへの変換量を決定する。その後、内在性アラバナ属アシルトランスフェラーゼによってトリグリセリドに取り込まれたARAの量を実施例7と同様にGCで評価する。

実施例 8

アラバナ (*Brassica napus*) におけるM. アルピナ (*M. alpina*)

Δ⁶デサチュラーゼの発現

以下のプライマー：

Ma524PCR-1 (配列番号27)

5' - CUACUACUACUATCTAGACTCGAGACCATGGCTGCTGCTCCAGTGTG

Ma524PCR-2 (配列番号28)

5' - CAUCAUCAUCAUAGGCCTCGAGTTACTGCGCCTTACCCAT

を用いてMa524 cDNAをPCRにより改変し、クローニング部位を導入した。

これらのプライマーは全コーディング領域の増幅を可能にし、XbaI及びXhoI部位を5' 末端に、並びにXhoI及びStuI部位を3' 末端に追加した。そのPCR産物をC1oneAmpシステム (GIBCOBRL) を用いてpAMP1 (GIBCOBRL) にサブクローン化してpCGN5535を作製し、両鎖の配列決定を行うことによりΔ⁶デサチュラーゼ配列を確認した。

種子特異的発現のため、Ma524コーディング領域をXhoI断片としてpCGN5535から切り出し、ナピン発現カセットpCGN3223のSalI部位に挿入してpCGN5536を作製した。ナピン5' 調節領域、Ma524コーディング領域、及びナピン3' 調節領域を含むpCGN5536のNotI断片をpCGN1557のNotI部位に挿入し、pCGN5538を作製した。pCGN5538をアグロバクテリウム仲介形質転換によりアラバ

ナ (*Brassica napus*) cv. LP004に導入した。

成熟するT₂種子を、温室内の6つの独立した形質転換結果物から集めた。単一の種子の脂肪酸組成をGCにより分析した。表5は対照LP004種子及び6つの5538系

統の結果を示す。# 8を除く全ての5538系統はGLAを含む種子を産生した。T2自家受粉種子集団について予想されるように、GLAの存在はこれらの種子において遺伝形質分離(segregate)した。GLAに加えて、M. アルピナ Δ 6デサチュラーゼは18:4 (ステアリドン酸 (stearidonic acid)) 及び6,9-18:2であるものと思われる他の脂肪酸を産生することが可能である。

上述の結果は、3種類の異なる基質特異性を有するデサチュラーゼを異種系において発現させ、多不飽和長鎖脂肪酸の産生に用いることができることを示す。前駆体20:3 (DGLA) からのARA (20:4) の産生、18:2基質からのGLA (18:3) の産生、及びGLAの前駆体である18:2への18:1基質の変換が例証された。

表5

Ma524トランスジェニックアブラナ属植物由来の種子の脂肪酸分析

SPL #	18:0	16:1	18:0	18:1	6:9	18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
LPO04-1	4.33	0.21	3.78	72.49	0	13.97	0	1.7	0	1.34	0.71	0.02	0.58	0.27	0.27
-2	4.01	0.16	3.09	73.59	0	14.36	0.01	1.4	0	1.43	0.66	0.02	0.5	0.2	0.2
-3	4.12	0.19	3.56	70.25	0	17.28	0	1.57	0	1.28	0.5	0.02	0.39	0.2	0.2
-4	4.22	0.2	2.7	70.25	0	17.66	0	1.61	0	1.31	0.53	0.02	0.4	0.24	0.24
-5	4.02	0.16	3.41	72.91	0	14.45	0.01	1.45	0	1.37	0.7	0.02	0.51	0.26	0.26
-6	4.22	0.18	3.23	71.47	0	15.92	0.01	1.52	0	1.32	0.69	0.02	0.51	0.27	0.27
-7	4.1	0.16	3.47	72.06	0	15.23	0	1.52	0	1.32	0.63	0.03	0.49	0.23	0.23
-9	4.01	0.17	3.71	72.98	0	13.97	0.01	1.41	0	1.45	0.74	0.03	0.58	0.23	0.23
-10	4.04	0.16	3.57	70.03	0	17.46	0	1.5	0	1.33	0.61	0.03	0.36	0.24	0.24
5538-1-1	4.61	0.2	3.48	68.12	1.37	10.68	7.48	1.04	0.33	1.19	0.49	0.02	0.33	0.13	0.13
-2	4.61	0.22	3.46	68.84	1.36	10.28	7.04	1.01	0.31	1.15	0.48	0.02	0.39	0	0
-3	4.78	0.24	3.24	65.86	0	21.36	0	1.49	0	1.08	0.46	0.02	0.38	0.22	0.22
-4	4.84	0.3	3.89	67.64	1.67	9.9	6.97	1.02	0.36	1.14	0.53	0.02	0.5	0.18	0.18
-5	4.64	0.2	3.58	64.5	3.61	8.85	10.14	0.95	0.48	1.19	0.47	0.01	0.33	0.12	0.12
-6	4.91	0.27	3.44	68.51	1.48	11.14	7.74	1.15	0.33	1.08	0.49	0.02	0.34	0.13	0.13
-7	4.87	0.22	3.24	65.78	1.27	11.92	8.38	1.2	0	1.12	0.47	0.02	0.37	0.16	0.16

表5

Ma524トランスジェニックアブラナ属植物由来の種子の脂肪酸分析

SPL #	16:0	16:1	18:0	18:1	6,9	18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
-8	4.59	0.22	3.4	70.77	0	16.71	0	1.36	0	1.14	0.48	0.02	0.39	0.15	
-9	4.63	0.23	3.51	69.66	2.01	8.77	7.24	0.97	0	1.18	0.52	0.02	0.3	0.11	
-10	4.56	0.19	3.55	70.68	0	16.89	0	1.37	0	1.22	0.54	0.02	0.22	0.03	
5538-3-1	4.74	0.21	3.43	67.52	1.29	10.91	7.77	1.03	0.28	1.11	0.5	0.02	0.35	0.14	
-2	4.72	0.21	3.24	67.42	1.63	10.37	8.4	0.99	0	1.12	0.49	0.02	0.36	0.15	
-3	4.24	0.21	3.52	71.31	0	16.53	0	1.33	0	1.12	0.45	0.02	0.4	0.14	
-4	4.64	0.21	3.45	67.92	1.65	9.91	7.97	0.91	0.33	1.14	0.47	0.02	0.37	0.14	
-5	4.91	0.25	3.31	67.19	0	18.92	0.01	1.39	0	1.05	0.48	0.02	0.37	0.14	
-6	4.67	0.21	3.25	67.07	1.23	11.32	8.35	0.99	0	1.16	0.47	0.02	0.33	0.16	
-7	4.53	0.19	2.94	64.8	4.94	8.45	9.95	0.93	0.44	1.13	0.37	0.01	0.27	0.12	
-8	4.66	0.22	3.68	67.33	0.71	12	6.99	1.1	0.24	1.18	0.48	0.03	0.36	0.17	
-9	4.65	0.24	3.11	67.42	0.64	12.71	6.93	1.16	0.25	1.08	0.45	0.02	0.32	0.17	
-10	4.88	0.27	3.33	65.75	0.86	12.89	7.7	1.1	0.24	1.08	0.46	0.01	0.34	0.16	
5538-4-1	4.65	0.24	3.8	62.41	0	24.68	0	1.6	0.01	0.99	0.45	0.02	0.33	0.13	
-2	5.37	0.31	3	57.98	0.38	18.04	10.5	1.41	0	0.99	0.48	0.02	0.3	0.19	
-3	4.61	0.22	3.07	63.62	0.3	16.46	7.67	1.2	0	1.18	0.45	0.02	0.29	0.14	

表5

Ma524トランスジェニックアブラナ属植物由来の種子の脂肪酸分析

SPL #	16:0	16:1	18:0	18:1	6,9	18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
-4	4.39	0.19	2.93	65.97	0	22.36	0	1.45	0	1.17	0.41	0.03	0.32	0.15	
-5	5.22	0.29	3.85	62.1	2.35	10.25	11.39	0.93	0.41	1.04	0.6	0.02	0.47	0.17	
-6	4.66	0.18	2.85	66.79	0.5	13.03	7.66	0.97	0.22	1.28	0.42	0.02	0.31	0.14	
-7	4.85	0.26	3.03	57.43	0.26	28.04	0.01	2.59	0.01	1.13	0.56	0.02	0.4	0.23	
-8	5.43	0.28	2.94	54.8	1.84	13.79	15.67	1.36	0.53	1.1	0.55	0.02	0.35	0.19	
-9	4.88	0.24	3.32	62.3	0.58	14.86	9.04	1.34	0.29	1.13	0.52	0.02	0.37	0.19	
-10	4.53	0.2	2.73	64.2	0.07	24.15	0	1.52	0	1.09	0.39	0.02	0.27	0.17	
5538-5-1	4.5	0.15	3.35	66.71	0.88	11.7	8.38	1.04	0.3	1.24	0.49	0.02	0.29	0.17	
-2	4.77	0.23	3.06	62.67	0.68	15.2	8.8	1.31	0.28	1.15	0.46	0.02	0.3	0.19	
-3	4.59	0.22	3.61	64.35	2.29	9.95	10.57	1.01	0.45	1.21	0.48	0.02	0.26	0.16	
-4	4.86	0.26	3.4	67.69	0.65	12.24	6.61	1.09	0.23	1.07	0.45	0.02	0.32	0.14	
-5	4.49	0.21	3.3	69.25	0.04	16.51	2.18	1.2	0	1.11	0.44	0.02	0.33	0.16	
-6	4.5	0.21	3.47	70.48	0.08	14.9	2.19	1.22	0	1.13	0.49	0.02	0.33	0.16	
-7	4.39	0.21	3.44	67.59	2.38	9.24	8.98	0.89	0	1.18	0.44	0.02	0.28	0.14	
-8	4.52	0.22	3.17	68.33	0.01	18.91	0.73	1.32	0.01	1.08	0.45	0.02	0.29	0.17	
-9	4.68	0.2	3.05	64.03	1.93	11.03	11.41	1.02	0.01	1.15	0.39	0.02	0.21	0.15	

表5

Ma524トランスジェニックアブラナ属植物由来の種子の脂肪酸分析

SPL #	16:0	16:1	18:0	18:1	6,9	18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
-10	4.57	0.2	3.1	67.21	0.61	12.62	7.68	1.07	0.25	1.14	0.43	0.02	0.25	0.15	
5538-8-1	4.95	0.26	3.14	64.04	0	23.38	0	1.54	0	0.99	0.42	0.02	0.38	0.17	
-2	4.91	0.26	3.71	62.33	0	23.97	0	1.77	0	0.95	0.53	0.02	0.42	0.19	
-3	4.73	0.25	4.04	63.83	0	22.36	0.01	1.73	0	1.05	0.55	0.02	0.45	0.16	
-4	5.1	0.35	3.8	60.45	0	24.45	0.01	2.13	0	1.07	0.65	0.03	0.53	0.24	
-5	4.98	0.3	3.91	62.48	0	23.44	0	1.77	0	1.01	0.51	0.01	0.43	0.21	
-6	4.62	0.21	3.99	66.14	0	20.38	0	1.48	0	1.16	0.53	0.02	0.48	0.19	
-7	4.64	0.22	3.55	64.6	0	22.65	0	1.38	0	1.09	0.45	0.02	0.41	0.19	
-8	5.65	0.38	3.18	56.6	0	30.83	0.02	0.02	0	0.98	0.55	0.03	0.39	0.26	
-9	8.53	0.63	6.9	51.76	0	26.01	0	0.01	0	1.41	1.21	0.07	0.96	0.33	
-10	5.52	0.4	3.97	57.92	0	28.95	0	0.02	0	0.95	0.52	0.02	0.41	0.16	
5538-10-1	4.44	0.19	3.5	68.42	0	19.51	0	1.32	0	1.14	0.45	0.02	0.31	0.16	
-2	4.57	0.21	3.07	66.08	0	21.99	0.01	1.36	0	1.12	0.41	0.02	0.31	0.16	
-3	4.63	0.21	3.48	67.43	0	20.27	0.01	1.32	0	1.12	0.46	0.02	0.21	0.08	
-4	4.69	0.19	3.22	64.62	0	23.16	0	1.35	0	1.08	0.46	0.02	0.33	0.2	
-5	4.58	0.2	3.4	68.75	0	20.17	0.01	0.02	0	1.1	0.45	0.02	0.34	0.17	

表5

Ma524トランスジェニックアブラナ属植物由来の種子の脂肪酸分析

SPL #	16:0		16:1		18:0		18:1		6,9 18:2		18:2		18:3ga		18:3		18:4		20:1		22:0		22:1		24:0		24:1	
	%		%		%		%		%		%		%		%		%		%		%		%		%		%	
-8	4.55	0.21			0	73.55			0.05	14.91		2.76	1.21	0.07	1.24	0.51	0.02	0.19	0									
-9	4.58	0.21	3.28	66.19				0	21.55		0	1.35	0	1.12	0.43	0.02	0.33	0.16										
-10	4.52	0.2	3.4	68.37				0	19.33	0.01	1.3	0	1.13	0.46	0.02	0.35	0.18											

実施例 9

アブラナ (*Brassica napus*) における M. アルピナ Δ^{12} デサチュラーゼの発現

以下のプライマー：

Ma648PCR-for (配列番号29)

5' - CUACUACUACUAGGATCCATGGCACCTCCCAACACT

Ma648PCR-rev (配列番号30)

5' -CAUCAUCAUCAUGGTACCTCGAGTTACTTCTTGAAAAAGAC

これらのプライマーは全コーディング領域の増幅を可能にし、BamHI部位を5'末端に、並びにKpnI及びXhoI部位を3'末端に追加した。そのPCR産物をCloneAmpシステム (GIBCOBRL) を用いてpAMP1 (GIBCOBRL) にサブクローン化してpCGN5540を作製し、両鎖の配列決定を行うことにより $\Delta 12$ デサチュラーゼ配列を確認した。

種子特異的発現のため、Ma648コーディング領域をBamHI/XhoI断片としてpCGN5540から切り出し、ナピン発現カセットpCGN3223のBglII及びXhoI部位の間に挿入してpCGN5542を作製した。ナピン5'調節領域、Ma648コーディング領域、及びナピン3'調節領域を含むpCGN5541のAsp718断片をpCGN5138のAsp718部位に挿入し、pCGN5542を作製した。pCGN5542をアグロバクテリウム仲介形質転換によりアブラナ (*Brassica napus*) の2種類の変種に導入した。市販のアブラナ変種SP30021、及び低リノレン系統LP30108を用いた。

成熟自家受粉T₂種子を、温室内で成長させた19の独立したLP30108形質転換結果物及び非形質転換対照から集めた。これらの種子は $\Delta 12$ デサチュラーゼ導入遺伝子について遺伝形質分離することが予想される。20種子のプールの脂肪酸組成をGCにより分析した。それらの結果を表6に示す。全ての形質転換系統は、 $\Delta 12$ デサチュラーゼの産生物である増加した量の18:2を含有していた。18:3の量はこれらの植物においては大きく増加してはいなかった。結果物#11及び16はプールした種子において18:2の最大蓄積を示した。これらのT₂種子における18:2の量の遺伝形質分離を調べて、後代に引き継がれる個々の植物を同定するため、半種子 (half-seed) 分析を行った。種子を一晩、暗所において、3

0度で、水に浸した濾紙上で発芽させた。外子葉をGC分析のために切除し、残りの実生は土壌に植えた。これらの分析のうちの幾つかの結果を表7に示す。M.アルピナ $\Delta 12$ デサチュラーゼを含む個々のT₂種子は最高60%の18:2をこれらの種子中に蓄積していた。サンプル97xx1116#59は遺伝形質分離のない (null segregant) 例である。最高の18:2蓄積体においても、18:3の濃度はわずかに増加した

だけであった。これらの、及び他の個別に選択されたT2植物を温室内及び野外で成長させ、T3種子を産生させた。

成熟自家受粉T2種子を、温室内で成長させた20個の独立したSP30021形質転換結果物及び非形質転換対照から集めた。これらの種子は $\Delta 12$ デサチュラーゼ導入遺伝子について遺伝形質分離することが予想される。20種子のプールの脂肪酸組成をGCにより分析した。そのデータは表8に提示されている。全ての形質転換系統は、 $\Delta 12$ デサチュラーゼの産生物である増加した量の18:2を含有していた。低リノレンLP30108系統と同様に、18:3の量は大きく増加してはいなかった。結果物#4及び12はプールした種子において18:2の最大蓄積を示した。これらのT2種子における18:2の量の遺伝形質分離を調べて、後代に引き継がれる個々の植物を同定するため、半種子分析を行った。種子を一晩、暗所において、30度で、水に浸した濾紙上で発芽させた。外子葉をGC分析のために切除し、残りの実生は土壤に植えた。これらの分析のうちの幾つかの結果を表9に示す。サンプル97xx1157#88及び#18は、それぞれ、5542-SP30021-4及び5542-SP30021-12について遺伝形質分離のない無偏出の例である。これらの、及び他の個別に選択されたT2植物を温室内及び野外で成長させ、T3種子を産生させた。

表6

サイクルID	SPL NO	株 ID	18:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
97XX1098	45	5542-LP30108-16	7.04	0.43	1.12	18.01	66.36	4.76	0.5	0.84	0.3	0.44
97XX1098	22	5542-LP30108-16	5.17	0.29	2.11	22.01	65.18	3.15	0.63	0.75	0.21	0.36
97XX1098	40	5542-LP30108-16	4.99	0.2	2.05	23.91	63.13	3.3	0.73	0.85	0.23	0.49
97XX1098	28	5542-LP30108-16	4.47	0.19	1.75	26.7	62.39	2.46	0.58	0.85	0.2	0.32
97XX1098	2	5542-LP30108-16	4.54	0.21	1.66	26.83	61.89	2.9	0.55	0.82	0.18	0.33
97XX1098	58	5542-LP30108-16	6.05	0.31	1.36	24.11	61.36	3.6	0.72	1.13	0.26	0.58
97XX1098	83	5542-LP30108-16	5.13	0.17	2.03	27.05	60.93	2.62	0.7	0.71	0.14	0.4
97XX1098	34	5542-LP30108-16	4.12	0.19	1.44	29.35	60.54	2.53	0.43	0.89	0.17	0.25
97XX1116	37	5542-LP30108-11	4	0.14	2.43	23.29	63.89	2.6	0.58	0.69	0.71	1.11
97XX1116	88	5542-LP30108-11	3.8	0.18	2.04	23.59	63.93	2.95	0.54	0.81	0.99	0.82
97XX1116	36	5542-LP30108-11	4.15	0.2	1.51	25.94	62.14	2.74	0.47	0.87	0.79	0.81
97XX1116	31	5542-LP30108-11	6.29	0.35	1.04	24.14	60.91	4.02	0.55	0.91	0.75	0.72
97XX1116	10	5542-LP30108-11	6.97	0.4	3.36	18.9	60.66	4.68	1.2	0.7	0.53	1.71
97XX1116	32	5542-LP30108-11	3.96	0.16	2.61	26.73	60.54	3.38	0.66	0.87	0.2	0.62
97XX1116	55	5542-LP30108-11	4.26	0.22	0.98	28.57	59.94	3.24	0.4	0.68	0.71	0.75
97XX1116	12	5542-LP30108-11	4.17	0.23	1.42	28.61	59.52	3.26	0.51	0.95	0.29	0.67

表6

サイクルID	SPL NO	株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
97XX1116	86	5542-LP30108-11	4.23	0.3	1.09	28.34	59.2	3.95	0.48	0.91	0.55	0.71
97XX1116	61	5542-LP30108-11	4.13	0.16	1.92	30.18	58.67	2.65	0.56	0.88	0.25	0.41
97XX1116	60	5542-LP30108-11	4.42	0.26	1.61	28.77	58.6	3.26	0.53	0.85	0.68	0.75
97XX1116	91	5542-LP30108-11	7.82	0.67	2.37	17.97	58.43	4.85	0.94	0.86	3.87	1.71
97xx1116	59	5542-LP30108-11	3.56	0.2	1.6	65.5	23.03	2.23	0.52	1.54	0.49	0.69

表7

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
5542-LP30108-1	4.6	0.15	1.93	50.44	38.54	2.06	0.65	1.11	0.09	0.37
5542-LP30108-2	4.63	0.17	1.78	41.11	47.63	2.46	0.62	1.02	0.14	0.38
5542-LP30108-3	4.96	0.18	2.07	48.16	40.01	2.17	0.73	1.13	0.1	0.39
5542-LP30108-4	4.36	0.15	1.94	46.51	42.57	1.95	0.64	1.06	0.11	0.36
5542-LP30108-5	4.45	0.14	2.19	49.54	39.13	2.14	0.72	1.14	0.11	0.38
5542-LP30108-6	4.97	0.16	1.86	49.23	39.2	2.17	0.7	1.12	0.11	0.41
5542-LP30108-7	4.46	0.13	2.72	39.6	48.65	2.02	0.81	0.96	0.13	0.4
5542-LP30108-8	4.63	0.18	1.78	47.86	41	2.31	0.62	1.09	0.11	0.36
5542-LP30108-9	4.64	0.16	1.75	42.5	46.57	2.2	0.81	1	0.13	0.35
5542-LP30108-10	4.46	0.15	2.37	43.61	45.29	1.77	0.71	1.02	0.12	0.36
5542-LP30108-11	4.58	0.25	1.88	37.08	50.95	2.94	0.84	0.96	0.16	0.42
5542-LP30108-12	4.46	0.16	1.69	43.62	45.36	2.44	0.59	1.09	0.14	0.34
5542-LP30108-13	4.45	0.15	2.33	51	37.71	1.91	0.75	1.12	0.09	0.4
5542-LP30108-14	4.3	0.16	2.04	45.93	42.78	2.46	0.66	1.07	0.14	0.37
5542-LP30108-15	4.18	0.16	2.17	43.79	45.2	2.14	0.68	1.04	0.15	0.36
5542-LP30108-16	5.04	0.18	1.89	32.32	55.78	2.68	0.63	0.84	0.2	0.36

表7

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
5542-LP30108-18	4.2	0.14	2.23	50.63	38.51	1.79	0.72	1.15	0.1	0.37
5542-LP30108-19	4.63	0.18	1.81	52.51	36.26	2.12	0.68	1.19	0.1	0.4
5542-LP30108-20	4.77	0.15	2.78	39.76	48.06	2.25	0.75	0.91	0.13	0.36
LP30108 对照	4.31	0.22	2.05	66.15	22.59	1.87	0.77	1.3	0.07	0.44

表8

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
5542-SP30021-1	4.37	0.17	2.17	40.26	39.43	11.06	0.74	1.14	0.14	0.42
5542-SP30021-2	4.33	0.18	1.51	43.07	36.03	12.57	0.57	1.21	0.14	0.33
5542-SP30021-3	5.2	0.22	3.1	43.7	37.04	8.03	0.92	1.06	0.13	0.48
5542-SP30021-4	4.37	0.15	1.94	34.26	45.12	12.04	0.6	0.98	0.17	0.3
5542-SP30021-5	4.15	0.17	1.73	48.98	31.13	11.41	0.63	1.26	0.13	0.35
5542-SP30021-6	4.52	0.17	1.92	38.1	42.39	10.53	0.67	1.04	0.18	0.39
5542-SP30021-7	4.58	0.18	1.66	41.87	37.52	11.8	0.62	1.14	0.15	0.36
5542-SP30021-8	4.46	0.17	1.59	42.69	36.93	11.88	0.59	1.14	0.14	0.35
5542-SP30021-9	4.63	0.19	1.69	39.89	39.75	11.48	0.62	1.09	0.15	0.38
5542-SP30021-10	4.74	0.16	1.79	39.19	40.51	11.42	0.63	0.99	0.13	0.34
5542-SP30021-11	4.57	0.16	1.71	38.13	42	11.15	0.62	1.04	0.18	0.36
5542-SP30021-12	4.05	0.16	2.04	35.44	43.47	12.45	0.62	1.07	0.21	0.33
5542-SP30021-13	4.37	0.15	1.79	38.74	41.28	11.36	0.62	1.04	0.16	0.35
5542-SP30021-14	4.32	0.16	1.47	42.32	37.17	12.3	0.54	1.16	0.16	0.32
5542-SP30021-15	4.25	0.18	1.65	44.96	34.28	12.39	0.59	1.13	0.14	0.32

表8

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
5542-SP30021-16	4.53	0.17	1.91	42.13	38.32	10.51	0.67	1.12	0.14	0.38
5542-SP30021-17	4.16	0.19	1.7	50.65	29.3	11.4	0.61	1.29	0.11	0.36
5542-SP30021-18	4.24	0.17	1.68	44.47	35.46	11.52	0.6	1.19	0.14	0.34
5542-SP30021-19	4.1	0.18	1.8	46.67	33.87	10.86	0.63	1.24	0.13	0.37
5542-SP30021-20	4.3	0.17	1.64	39.6	40.39	11.53	0.57	1.12	0.16	0.32
SP30021	4.36	0.21	1.47	56.51	22.59	12.04	0.62	1.45	0.11	0.39

表9

サイクルID	SPL NO	株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
97XX1156	96	5542-SP30021-4	3.71	0.13	1.36	28.29	51.74	11.57	0.41	0.85	0.18	0.46
97XX1158	50	5542-SP30021-4	2.95	0.11	1.33	28.78	50.97	13.83	0.3	0.99	0.28	0.32
97XX1158	10	5542-SP30021-4	4.05	0.16	2.47	31.18	50.88	8.77	0.67	0.89	0.22	0.33
97XX1158	32	5542-SP30021-4	3.56	0.15	1.44	30.73	50.1	11.86	0.47	0.91	0.21	0.22
97XX1158	56	5542-SP30021-4	4.44	0.19	3.09	30.64	49.71	9.39	0.83	0.79	0.2	0.4
97XX1157	80	5542-SP30021-4	4.05	0.18	1.32	27.41	48.59	14.81	0.53	1.19	0.29	0.4
97XX1158	39	5542-SP30021-4	4.04	0.15	2.98	28.62	49.52	12.28	0.69	0.86	0.31	0.27
97XX1156	17	5542-SP30021-4	3.65	0.15	2.43	29.38	49.42	12.3	0.52	0.92	0.67	0.35
97XX1156	60	5542-SP30021-4	3.75	0.17	1.7	30.03	49.13	12.87	0.51	1.01	0.27	0.35
97XX1157	83	5542-SP30021-4	4.15	0.2	1.77	29.72	49.08	12.22	0.66	1.21	0.16	0.62
97XX1157	86	5542-SP30021-4	3.6	0.14	1.12	27.65	49.01	16.05	0.48	1.21	0.33	0.08
97XX1158	77	5542-SP30021-4	4.14	0.17	1.58	31.98	48.82	10.72	0.65	1	0.28	0.44
97XX1157	88	5542-SP30021-4	3.36	0.15	1.22	56.42	21.63	13.78	0.58	1.85	0.06	0.65

表9

サイクルID	SPL NO	株 ID	16:0	18:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0
97XX1157	39	5542-SP30021-12	2.84	0.04	1.84	29.6	53.16	9.52	0.57	1.32	0.35	0.48
97XX1157	55	5542-SP30021-12	3.28	0.1	2.18	30.36	52.27	9.28	0.63	1.15	0.22	0.41
97XX1157	10	5542-SP30021-12	3.5	0.06	1.51	28.78	50.98	11.13	0.64	1.45	0.4	0.26
97XX1157	41	5542-SP30021-12	3.31	0.08	1.64	30.18	50.51	11.59	0.57	1.27	0.24	0.41
97XX1157	35	5542-SP30021-12	3.31	0.09	1.57	30.36	50.1	12.17	0.5	1.15	0.23	0.35
97XX1157	1	5542-SP30021-12	3.45	0.11	2.88	32.11	49.45	8.69	0.82	1.22	0.27	0.63
97XX1157	16	5542-SP30021-12	2.91	0.09	1.52	29.35	48.88	14.26	0.58	1.39	0.15	0.3
97XX1157	50	5542-SP30021-12	3.29	0.09	2.13	33.23	48.78	9.87	0.67	1.06	0.18	0.47
97XX1157	25	5542-SP30021-12	2.83	0.05	1.4	33.22	48.52	11.22	0.5	1.33	0.26	0.42
97XX1157	57	5542-SP30021-12	2.94	0.13	1.46	32.85	47.58	12.21	0.57	1.31	0.27	0.47
97XX1157	58	5542-SP30021-12	3.01	0.07	1.63	31.53	47	14.02	0.59	1.31	0.28	0.23
97XX1157	6	5542-SP30021-12	3.9	0.13	1.5	32.43	46.98	12.45	0.52	1.11	0.21	0.49
97XX1157	18	5542-SP30021-12	3.88	0.16	1.73	57.94	22.33	10.51	0.74	1.68	0.11	0.64

実施例10

アブラナ (*Brassica napus*) における M. アルピナ $\Delta 6$ 及び $\Delta 12$ デサチュラーゼの

同時発現

M. アルピナ $\Delta 6$ 及び $\Delta 12$ デサチュラーゼを同じ T-DNA から発現させるため、以下の種子特異的発現のための構築体を作製した。

ナピン 5' 調節領域、Ma524 コーディング領域、及びナピン 3' 調節領域を含む pCGN5536 の NotI 断片を pCGN5542 の NotI 部位に挿入し、pCGN5544 を作製した。発現

モジュールは、Ma524及びMa648及びnptIIマーカーからの転写の方向が同じになるように配向した。

pCGN5544をアグロバクテリウム仲介形質転換によりアブラナ (*Brassica napus*) cv.LP30108に導入した。成熟自家受粉T₂種子を、温室内で成長させた16個の独立したLP30108形質転換結果物及び非形質転換対照から集めた。これらの種子は $\Delta^6 + \Delta^{12}$ デサチュラーゼ導入遺伝子について遺伝形質分離することが予想される。20種子のプールの脂肪酸組成をGCにより分析した。それらの結果が表10に提示されている。系統のうちの1つ (5544-LP30108-3) を除く全ての形質転換系統が、対照と比較して油組成の変化を示す。GLAは系統のうちの3つ (-3、-4、-11) を除く全てにおいて産生された；GLAを含まないこれら3つのうちの2つ (-4、-11) は18:2の増加を示し、これは Δ^{12} デサチュラーゼの発現を示すものである。群としては、二重 $\Delta^6 + \Delta^{12}$ 構築体 (pCGN5544) を含む植物において観察されるGLAの量は、pCGN5538 (Δ^6 単独) を含む植物よりも高かった。加えて、 Δ^6 18:2の量は、 Δ^6 単独と比較して、 $\Delta^{12} + \Delta^6$ を含む植物において大きく低下していた。したがって、1つのT-DNA上での Δ^6 及び Δ^{12} デサチュラーゼの組み合わせは、 Δ^6 デサチュラーゼ単独の発現よりも多くのGLA及び少ない副生物の蓄積につながる。これらのT₂種子におけるGLA量の遺伝形質分離を調べて、後代に引き継がれる個々の植物を同定するため、半種子分析を行った。種子を一晩、暗所において、30度で、水に浸した濾紙上で発芽させた。外子葉をGC分析のために切除し、残りの実生は土壌に植えた。これらの分析のうちの幾つかの結果を表11に示す。T₂集団について予想されるように、

GLA及び18:2の量は個々の種子において遺伝形質分離している。全脂肪酸のうちの60%以下のGLA含量が個々の種子において観察された。個々の結果物を選択し、T₃種子を産生させるために温室内及び野外で成長させた。

本発明の構築体を発現する、アブラナ属植物、ダイズ、ベニバナ、トウモロコシ、アマ及びヒマワリを含むトランスジェニック植物がGLAの良好な供給源であり得る。

ルリチシャのようなGLAの典型的な供給源が産生するGLAは、最大でも25%であ

る。対照的に、表10における植物は最高30%のGLAを含む。さらに、表11に示される個々の種子は最高60%のGLAを含む。

表10

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	22:0
					Δ6,9	Δ9,12	Δ6,9,12	Δ9,12,15				
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
5544-LP30108-1	4.54	0.17	1.91	49.96	0	30.98	7.97	1.85	0.11	0.68	1.17	0.41
5544-LP30108-2	4.69	0.19	2.15	38.49	0	33.94	16.21	1.73	0.25	0.72	0.96	0.41
5544-LP30108-3	4.26	0.2	1.97	66.68	0	22.13	0.08	1.96	0.01	0.73	1.33	0.42
5544-LP30108-4	4.59	0.24	1.76	44.21	0	44.54	0.02	2.19	0.01	0.62	1.08	0.4
5544-LP30108-5	4.5	0.18	2.28	47.57	0	26.41	14.42	1.71	0.22	0.78	1.1	0.43
5544-LP30108-6	4.51	0.16	2.12	31.95	0.01	26.94	29.8	1.41	0.5	0.81	1.02	0.51
5544-LP30108-7	4.84	0.21	1.68	38.24	0	32.27	18.21	1.87	0.33	0.66	1.04	0.43
5544-LP30108-10	5	0.28	1.86	41.17	0	46.54	0.36	2.58	0.02	0.6	0.91	0.37
5544-LP30108-11	4.57	0.2	1.74	47.29	0	41.49	0.03	2.22	0.01	0.64	1.17	0.4
5544-LP30108-12	4.87	0.18	2.65	34.53	0	30.37	23.12	1.46	0.36	0.83	0.95	0.45
5544-LP30108-13	4.41	0.16	2.32	40.82	0.11	26.8	21.05	1.53	0.37	0.77	1.06	0.42
5544-LP30108-14	4.36	0.2	2.21	29.91	0.16	28.01	30.62	1.46	0.59	0.76	0.97	0.47
5544-LP30108-15	4.79	0.22	2.23	23.42	0.02	28.73	35.58	1.51	0.77	0.87	0.89	0.56
5544-LP30108-16	4.54	0.18	1.78	40.81	0	35.24	12.83	1.95	0.27	0.68	1.02	0.43
5544-LP30108-17	4.63	0.18	2.28	46.96	0	31.06	10.6	1.7	0.14	0.76	1.06	0.42
5544-LP30108-20	4.87	0.29	1.44	31.81	0.15	23.51	32.85	1.64	0.69	0.89	0.96	0.67

表10

18:0	18:1	18:0	18:1	18:2	18:1	18:2	18:2	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	22:0
							$\Delta 6,9$	$\Delta 8,12$	$\Delta 8,9,12$	$\Delta 9,12,15$			
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
LP30108 对照	3.89	0.25	1.19	67.73	0	22.46	0.1	1.97	0	0.54	1.32	0.44	

表11

サイクルID	SPL NO	株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 15	18:4	20:0	20:1
97XX1333	64	5544-LP30108-20	6.53	0.15	0.88	23.33	0.01	21.1	43.3	1.34	0.84	0.52	0.97
97XX1333	65	5544-LP30108-20	6.9	0.29	1.17	8.89	0.03	15.07	60.5	1.12	2.23	0.98	0.86
97XX1333	66	5544-LP30108-20	8.15	0.2	3.6	16.87	0.11	16.05	48.23	1.1	1.18	1.71	0.66
97XX1333	67	5544-LP30108-20	8.85	0.35	1.2	14.49	0.01	25.66	43.98	1.8	1.03	0.65	0.76
97XX1333	68	5544-LP30108-20	6.05	0.16	1.27	17.85	0.16	16.13	53.16	1.14	1.25	0.71	0.85
97XX1333	69	5544-LP30108-20	7.16	0.21	1.33	11.51	0.09	17.42	56.13	1.41	1.58	0.93	0.68
97XX1333	70	5544-LP30108-20	3.46	0.04	1.76	18.38	0.03	22.55	48.55	1.22	1.04	0.83	0.95
97XX1333	71	5544-LP30108-20	3.71	0.05	1.74	16.11	0.01	26.93	45.79	1.47	1.02	0.89	1
97XX1333	72	5544-LP30108-20	3.5	0.04	1.76	23.74	0.02	35.38	30.82	1.87	0.58	0.65	0.89
97XX1333	73	5544-LP30108-20	4.67	0.11	1.87	17.98	0.04	22.47	47.89	1.17	0.89	0.93	0.88
97XX1333	74	5544-LP30108-20	4.52	0.09	1.86	13.77	0.03	20.9	52.96	1.31	1.19	1.03	0.88
97XX1333	75	5544-LP30108-20	5.26	0.13	1.64	16.46	0.05	21.75	49.42	1.25	1.08	0.83	0.86
97XX1333	76	5544-LP30108-20	7.61	0.21	1.44	12.49	0.33	17	55.31	1.18	1.59	0.88	0.74
97XX1333	77	5544-LP30108-20	6.42	0.15	1.51	10.79	0.09	15.96	58.77	1.12	1.53	0.98	0.85
97XX1333	78	5544-LP30108-20	4.59	0.16	0.93	12.1	0.08	15.94	60.15	1.12	1.69	0.74	0.88
97XX1333	79	5544-LP30108-20	5.24	0.09	1.94	14.08	0.21	19.79	53.58	1.05	1.03	0.96	0.84

表11

サイクルID	SPL NO	株ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 15	18:4	20:0	20:1
97XX1333	80	5544-LP30108-20	4.38	0.08	1.66	22.25	0	30.79	35.49	2.16	0.72	0.66	0.84
97XX1333	81	5544-LP30108-20	4.05	0.05	1.44	24.16	0.04	24.86	40.89	1.42	0.78	0.63	0.84
97XX1333	82	5544-LP30108-20	3.29	0.05	1.9	19.66	0	23.83	48.48	1.27	0.87	0.78	0.81
97XX1333	83	5544-LP30108-20	4.82	0.08	1.99	17.27	0.1	20.69	49.73	1.22	1.06	0.98	0.82
97XX1333	84	5544-LP30108-20	5.33	0.1	1.77	13.6	0.03	21.44	51.74	1.52	1.21	0.98	0.93
97XX1333	85	5544-LP30108-20	3.3	0.05	1.2	68.23	0	22.09	0.01	2.27	0	0.57	1.57
97XX1333	86	5544-LP30108-20	3.23	0.05	1.54	28.15	0.01	36.4	25.91	1.99	0.43	0.58	0.97
97XX1333	87	5544-LP30108-20	4.38	0.1	1.16	60.94	2.85	8.35	17.81	1.26	0.69	0.54	1.39
97XX1333	88	5544-LP30108-20	4.4	0.09	1.34	38.42	0.02	34.74	16.61	2.12	0.32	0.53	0.82
97XX1278	16	5544-LP30108-15	3.62	0.11	1.22	27.23	0	30.9	32.87	1.41	0.48	0.46	0.97
97XX1278	17	5544-LP30108-15	3.68	0.13	1.28	45.29	0	44.78	0.72	1.77	0.01	0.43	1.24
97XX1278	18	5544-LP30108-15	4.08	0.15	1.49	22.34	0	28.37	39.37	1.22	0.64	0.55	0.88
97XX1278	19	5544-LP30108-15	3.51	0.1	1.01	35.44	0	44.12	11.7	1.72	0.15	0.36	1.14
97XX1278	20	5544-LP30108-15	3.66	0.12	1.21	27.44	0	30.2	32.37	1.49	0.53	0.49	1.15
97XX1278	21	5544-LP30108-15	3.58	0.11	1.51	29.81	0	30.72	30.65	1.16	0.4	0.5	0.96
97XX1278	23	5544-LP30108-15	3.69	0.11	1.42	30.05	0	32.28	27.41	1.65	0.38	0.54	1.19
97XX1278	24	5544-LP30108-15	3.56	0.11	1.31	30.25	0	28.64	31.48	1.43	0.48	0.48	1.11

表11

サイクルID	SPL NO	株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 15	18:4	20:0	20:1
97XX1278	25	5544-LP30108-15	4.41	0.22	2.08	15.05	0	23.77	49.51	1.18	0.96	0.87	0.85
97XX1278	26	5544-LP30108-15	3.75	0.14	1.59	23.55	0	27.91	38.8	1.39	0.61	0.59	0.97
97XX1278	27	5544-LP30108-15	3.67	0.11	1.9	26.07	0	31.1	33.16	1.08	0.49	0.65	0.97
97XX1278	28	5544-LP30108-15	3.82	0.11	1.54	21.27	0	29.07	39.69	1.47	0.7	0.58	0.86
97XX1278	29	5544-LP30108-15	3.65	0.14	1.27	45.84	0	43.38	1	2.33	0.02	0.42	1.27
97XX1278	30	5544-LP30108-15	3.59	0.12	1.19	30.41	0	30.68	30.37	1.24	0.4	0.37	0.99
97XX1278	31	5544-LP30108-15	3.74	0.12	1.28	38.98	0	50.53	0.98	2.12	0.02	0.39	1.14
97XX1278	32	5544-LP30108-15	3.86	0.11	1.46	26.38	0	28.9	35.41	1.01	0.5	0.54	0.97

実施例11

アブラナ(Brassica napus)におけるM. アルピナ Δ^5 及び Δ^6 デサチュラーゼの同

時発現

トランスジェニックアブラナの油中にアラカドン酸 (arachadonic acid) (ARA) を産生させるため、 Δ^5 及び Δ^6 デサチュラーゼ活性を導入する必要がある。下流の特徴付け及び繁殖を容易にするため、両活性を単一のT-DNAによってコードさせることが有利であり得る。以下の例は Δ^5 及び Δ^6 デサチュラーゼの同時発現を説明する。

ナピン5' 調節領域、Ma29コーディング領域、及びナピン3' 調節領域を含むpCGN5528のAsp718断片をpCGN5138のAsp718部位に挿入し、pCGN5545を作製した。ナピン5' 調節領域、Ma524コーディング領域、及びナピン3' 調節領域を含むpCGN5536のNotI断片をpCGN5545のNotI部位に挿入し、pCGN5546を作製した。発現モジュールは、Ma524及びMa29及びnptIマーカからの転写の方向が同じになるように配向した。

pCGN5546をアグロバクテリウム仲介形質転換によりアブラナ (*Brassica napus*) cv.LP30108に導入した。成熟自家受粉T2種子を、温室内で成長させた30個の独立したLP30108形質転換結果物から集めた。20種子のプールの脂肪酸組成をGCにより分析した。それらの結果を表12に示す。 $\Delta^{5,9}18:2$ (pCGN5531植物に見られる) 及び $\Delta^{6,9}18:2$ 及びGLA (pCGN5538植物に見られる) の存在によって立証されるように、全ての系統が両デサチュラーゼの発現を示す。

表12

5546-LP30108結果物(event)からの成熟T2種子の20種子ブールの脂肪酸分析

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ5,9	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 15	18:4	20:0	20:1
5546-LP30108-1	4.88	0.33	2.28	57.2	4.68	6.08	7.36	12.29	1.38	0.85	0.84	1.22
5546-LP30108-2	4.01	0.14	2.22	66.04	2.73	1.33	12.6	6.45	1.41	0.32	0.75	1.2
5546-LP30108-3	4.29	0.15	2.55	68.89	0.44	0.68	16.97	1.86	1.6	0.11	0.88	1.22
5546-LP30108-4	4.24	0.14	2.6	70.48	0.73	0.52	14.28	2.61	1.42	0.14	0.96	1.26
5546-LP30108-5	3.52	0.15	2.01	60.3	1.72	0.95	16.92	9.88	1.66	0.39	0.68	1.26
5546-LP30108-6	4.05	0.17	2.24	61.29	1.98	0.4	18.87	6.28	2	0.34	0.7	1.24
5546-LP30108-7	4.74	0.21	2.49	64.5	2.25	1.18	10.03	9.73	1.35	0.52	0.97	1.28
5546-LP30108-8	4.24	0.14	2.82	63.92	1.9	1.5	11.67	9.29	1.44	0.43	0.89	1.19
5546-LP30108-9	3.8	0.13	2.15	65.75	2.3	0.16	14.92	6.32	1.57	0.24	0.75	1.35
5546-LP30108-10	4.28	0.17	1.55	58.8	1.1	0.12	22.95	5.97	2.24	0.22	0.6	1.35
5546-LP30108-11	4.25	0.15	1.82	63.68	1.01	0.22	19.42	4.96	1.81	0.2	0.67	1.23
5546-LP30108-12	3.95	0.14	2.36	66.9	1.12	0.01	19.42	1.59	1.77	0.04	0.8	1.21
5546-LP30108-13	4.18	0.16	2.17	66.91	1.36	0.02	18.84	1.99	1.74	0.05	0.77	1.15
5546-LP30108-14	4.74	0.26	1.82	65.29	1.25	0.27	16.77	5.3	1.59	0.25	0.71	1.32
5546-LP30108-15	4.3	0.23	2.54	65.65	1.67	0.69	13.15	7.22	1.54	0.36	0.88	1.3
5546-LP30108-16	4.05	0.17	2.75	64.13	2.56	2.8	9.56	9.31	1.34	0.53	0.92	1.28

表12

5546-LP30108結果物(event)からの成熟T2種子の20種子プールの脂肪酸分析

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ5,9	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 15	18:4	20:0	20:1
5546-LP30108-17	4.06	0.13	2.85	65.76	2.09	1.92	9.65	9.1	1.23	0.45	0.92	1.22
5546-LP30108-18	4.16	0.25	2.14	60.68	1.43	0.02	24.02	2.82	2.11	0.09	0.69	1.26
5546-LP30108-19	5.77	0.37	2.15	56.11	1.6	0.33	19.34	9.16	2.37	0.46	0.73	1.05
5546-LP30108-20	5.03	0.36	2.34	61.05	1.55	0.35	17.21	6.96	2.24	0.39	0.77	1.22
5546-LP30108-21	4.52	0.3	2.71	62.14	1.33	0.23	17.62	6.44	1.88	0.28	0.88	1.15
5546-LP30108-22	5.91	0.44	2.15	60.12	1.41	0.36	17.04	7.75	1.97	0.36	0.78	1.07
5546-LP30108-23	4.28	0.22	2.44	66.19	0.93	0.11	17.03	4.37	1.67	0.17	0.82	1.25
5546-LP30108-24	4.92	0.33	2.68	62.6	1.32	0.36	16.89	5.82	2.05	0.3	0.95	1.19
5546-LP30108-25	5.42	0.72	3.15	47.47	2.66	4.21	13.51	16.31	2.14	0.99	1.18	1.37
5546-LP30108-26	3.85	0.22	2.78	65.02	1.05	0.05	18.36	4.36	1.67	0.12	0.82	1.18
5546-LP30108-27	3.86	0.15	2.76	65.17	1.11	0.78	16.24	5.21	1.53	0.25	0.93	1.3
5546-LP30108-28	5.29	0.42	1.81	49.12	1.07	0.09	30.52	5.21	3.57	0.44	0.67	1.23
5546-LP30108-29	4.4	0.2	2.38	65.95	1.05	0.28	16.31	4.85	1.84	0.19	0.85	1.26
5546-LP30108-30	3.99	0.19	2.55	67.47	0.83	0.11	17.02	3.18	1.68	0.13	0.83	1.23

実施例12

アブラナ(Brassica napus)におけるM. アルピナΔ5、Δ6及びΔ12デサチュラ

ーゼの同時発現

トランスジェニックアブラナの油中におけるARAの最適な産生を達成するためには、 Δ^5 活性に加えて Δ^6 及び Δ^{12} デサチュラーゼ活性の両者が存在する必要がある。下流の特徴付け及び繁殖を容易にするため、これらの活性の全てを単一のT-DNAによってコードさせることが有利であり得る。以下の例は Δ^5 、 Δ^6 及び Δ^{12} デサチュラーゼの同時発現を説明する。

ナピン5' 調節領域、Ma29コーディング領域、及びナピン3' 調節領域を含むpCGN5528のHindIII断片をpCGN5544のHindIII部位に挿入し、pCGN5547を作製した。発現モジュールは、Ma29、Ma524、Ma648及びnptIIマーカーからの転写の方向が同じになるように配向した。

pCGN5547をアグロバクテリウム仲介形質転換によりアブラナ (*Brassica napus*) cv. LP30108に導入した。成熟自家受粉T2種子を、温室内で成長させた30個の独立したLP30108形質転換結果物から集めた。20種子のプールの脂肪酸組成をGCにより分析した。それらの結果を表13に示す。27の系統がかなりの量のGLAの蓄積を示し、一般には、観察されたGLAの量は、 Δ^{12} デサチュラーゼを含まない5546植物において見られるものよりも高かった。大部分の植物において、検出可能な $\Delta^{6,9} 18:2$ の量及び高い $18:2$ の量が欠如していることによって立証されるように、この Δ^{12} デサチュラーゼはほとんどの系統において活性であるものと思われる。その濃度は一般には5546植物において観察されるものを下回るものの、少量の $\Delta^{5,9} 18:2$ が5547植物において見られる。これは、 Δ^5 位置で不飽和化可能となる前に $18:1$ を $18:2$ に効率的に変換する Δ^{12} デサチュラーゼの存在によるものである可能性がある。

表13

5547-LP30108結果物(event)からの成熟T2種子の20種子ブールの脂肪酸分析

株ID	12:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ5, 9	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 15	18:4	20:0	20:1	22:1	22:2
5547-LP30108-1	0.0	5.38	0.3	2.23	64.12	0.01	0	22.67	0.44	2.17	0.07	0.82	1.11	0.03	0
5547-LP30108-2	0.1	4.45	0.13	2.29	51.57	0.16	0	33.85	3.18	1.74	0.03	0.78	1.02	0.03	0.02
5547-LP30108-3	0.0	4.18	0.12	2.03	59.61	0.03	0	29.44	0.44	1.64	0	0.75	1.15	0.03	0.01
5547-LP30108-4	0.0	4.35	0.15	2.29	50.59	0.12	0.01	37.31	0.85	1.88	0.02	0.78	1.02	0.02	0.01
5547-LP30108-5	0.0	4.59	0.14	1.83	49	0.25	0.01	31.65	8.16	1.86	0.13	0.68	1.04	0.02	0
5547-LP30108-6	0.0	4.11	0.15	2.53	44.3	0.13	0	28.12	15.89	1.94	0.28	0.82	1.13	0	0
5547-LP30108-7	0.0	4.27	0.15	2.55	39.18	0.12	0.02	27	21.72	1.87	0.45	0.89	1.08	0	0
5547-LP30108-8	0.0	4.3	0.14	2.92	42.83	0.26	0	30.81	14.51	1.49	0.22	0.89	1.06	0	0
5547-LP30108-9	0.0	4.48	0.17	3.13	44.51	0	0	30.12	12.87	1.76	0.22	0.98	1.12	0.01	0
5547-LP30108-10	0.0	4.28	0.11	2.62	41.44	0.28	0	30.89	16.28	1.45	0.21	0.82	1.06	0	0
5547-LP30108-11	0.0	4.47	0.17	2.43	26.96	0.48	0	34.44	25.01	2.14	0.63	0.84	0.99	0	0
5547-LP30108-12	0.0	4.36	0.16	2.68	42.2	0.17	0	29.78	15.93	1.83	0.27	0.88	1.06	0	0
5547-LP30108-13	0.0	4.87	0.19	2.81	21.7	0.53	0	32.83	30.64	2.04	0.8	1	0.89	0.02	0.01
5547-LP30108-14	0.0	4.61	0.25	2.6	54	0	0	32.98	0.5	2.46	0.03	0.86	1.14	0	0
5547-LP30108-15	0.0	4.07	0.14	2.98	37.09	0.14	0.01	29.01	21.55	1.66	0.38	1.06	1.11	0	0

表13

5547-LP30108結果物(event)からの成熟T2種子の20種子プールの脂肪酸分析

株 ID	12:0	16:0	16:1	18:0	18:1	9	18:2_Δ5	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9	12	15	18:3_Δ9,12	18:4	20:0	20:1	22:1	22:2
	15																	
	12																	
5547-LP30108-16	0.0	3.63	0.13	2.12	64.69	0	0	0	24.21	0.15	2.04	0	0.82	1.56	0.02	0	0	0
5547-LP30108-17	0.0	3.85	0.18	2.22	67.22	0.01	0	0	21.25	0	2.27	0	0.83	1.53	0	0	0	0
5547-LP30108-18	0.0	5.46	0.19	2.87	41.83	0.1	0.04	0	22.76	21.45	1.72	0.48	1.06	1.23	0	0	0	0
5547-LP30108-19	0.0	4.33	0.12	2.73	50.31	0.07	0	0	24.77	12.72	1.62	0.21	1.04	1.29	0	0.01	0	0.01
5547-LP30108-20	0.0	4.22	0.12	2.91	46.33	0.25	0	0	26.87	14.65	1.61	0.22	0.98	1.18	0	0	0	0
5547-LP30108-21	0.0	4.38	0.17	2.37	55.37	0	0	0	32.59	0.53	1.85	0.03	0.83	1.23	0	0	0	0
5547-LP30108-22	0.0	5.5	0.18	2.71	41.93	0.1	0.19	0	24.19	20.14	1.76	0.45	0.94	1.21	0	0	0	0
5547-LP30108-23	0.0	4.03	0.16	2.17	68.44	0	0	0	20.09	0	2.19	0.02	0.83	1.46	0	0	0	0
5547-LP30108-24	0.0	4.19	0.17	2.72	49.31	0	0	0	30.38	8.84	1.85	0.13	0.86	1.16	0	0	0	0
5547-LP30108-25	0.0	4.04	0.17	2.1	70.48	0	0	0	18.04	0.05	2.09	0	0.86	1.54	0	0	0	0
5547-LP30108-26	0.0	4.74	0.22	3.2	26.74	0.33	0	0	30.05	28.95	2.02	0.78	1.08	0.99	0	0	0	0
5547-LP30108-27	0.0	4.29	0.18	2.23	52.49	0	0	0	28.48	7.36	1.91	0.13	0.87	1.37	0	0	0	0
5547-LP30108-28	0.0	4.36	0.17	3	44.35	0.2	0	0	29.59	13.39	1.91	0.23	0.96	1.17	0	0	0	0
5547-LP30108-29	0.0	4.32	0.17	2.94	52.53	0.05	0	0	33.88	0.91	2.34	0.01	0.97	1.23	0	0	0	0
5547-LP30108-30	0.0	4.07	0.14	2.89	45.13	0.01	0	0	29.06	13.96	1.71	0.2	0.94	1.2	0.01	0	0	0

Δ⁶-不飽和化油の立体特異的分布

この実験は、pCGN5538 (Ma524 cDNA) を発現する種子におけるΔ⁶-不飽和化油の立体特異的分布を調べるために設計された。3種類の種子サンプルを用いた：

- 1) 非形質転換アブラナ (*B. napus*) cv. LP004 種子 (対照)
- 2) pCGN5538-LP004-19 の、遺伝形質分離する T₂ 種子
- 3) pCGN5538-LP004-29 の、遺伝形質分離する T₂ 種子

以下のプロトコルを分析に用いた：

1. 種子油の抽出

50個の種子を12×32mmバイアルに入れ、ガラス棒で粉碎した。1.25mLのヘキサンを添加し、その混合物を渦巻き巻き攪拌した。振盪器で種子を一晩抽出した。次に、この抽出物を、1ccシリンジに装着した0.2ミクロンフィルターを通して濾過した。その後、この抽出物を窒素の下で乾燥させた。生じた油を全油サンプルの消化及び誘導體化に用いた。

2. 消化

A. 液体油消化

TAGの50%消化を得るため、貯蔵リパーゼ (*Rhizopus arrhizus* 由来、Sigma、L 4384) を約600,000単位/mLに希釈した。この貯蔵リパーゼを4℃に維持し、氷上に置く。試薬の量は消化しようとする油の量に従って調整することができる。

以下の量は2.0mgの抽出油サンプルに基づくものである。12×32mmスクリーキャップバイアルに以下のものを加えた：2.0mgの油、200 μ Lの0.1Mトリス HCl pH7、40 μ Lの2.2w/v% CaCl₂ · 2H₂O、及び100 μ Lの0.05w/v%胆汁酸塩。これらの物質を渦巻き攪拌及び超音波処理して油中に分散させた。20 μ Lの希釈リパーゼを添加し、その混合物を室温で1.0分間連続的に渦巻き攪拌した。白色沈殿が形成された。反応を100 μ Lの6M HCl 及び渦巻き攪拌で停止させた。500 μ LのCHCl₃ : CH₃OH (2:1) を添加し、その混合物を渦巻き攪拌して、残りの消化を行う間氷上に保持した。サンプルを再度渦巻き攪拌

し、簡単に遠心分離して層を明確した。消化産物を含む下層をパスツールピペッ

トで取り出し、12×32mmクリンブキャップ・バイアルに入れた。次に、この物質を300 μ LのCHCl₃で再抽出し、渦巻き攪拌し、遠心分離して、下層と合わせた。できる限り多い量の氷の上に消化産物を保持した。消化の後できるだけ早くHPLC分離を行ってアシル移動 (acyl migration) を最小化した。

B. 固形脂肪消化

20 μ Lの11:0メチルエステルを2.0mgの固形脂肪に添加することを除いて、上述の液体油消化の手順に従った。

3. HPLC分離

消化産物をクロロホルム中で約200 μ Lまで乾燥させた。次に、各々のサンプルを8×40mmシェルバイアル (shell vial) 内のインサートに移し、30 μ LをHPLC分析のために注入した。

この高速液体クロマトグラフィー・システムは、管温度が105℃で窒素ガス流が40mL/分であるVarex ELSD IIA蒸発光散乱検出器; Waters 712 Wispオートサンプラー、3つのBeckman 114M Solvent Delivery Module; Beckman 421Aコントローラー、Rheodyne気体作動流 (pneumatically actuated stream) 型スプリッター; 及びGilsonマイクロ・フラクショネーターを備えていた。クロマトグラフィーカラムは、Brownleeによる220×4.6mm、5ミクロン正常相シリカ・カートリッジである。

用いた3種類の溶媒は:

A=ヘキサン:トルエン 1:1

B=トルエン:酢酸エチル 3:1

C=酢酸エチル中5%のギ酸

であった。

勾配プロフィールは以下の通りであった:

時間 (分)	画分	値	持続時間
0流動	2.0mL/分		
0%B	10		
0%C	2		
2%C	25		6分
14.0%C	2		1分
15.0	プログラム終了		

クロマトグラフィー標準混合液は、ヘキサン：トルエン 1：1中に以下のものを含めて調製する：

0.2mg/mLトリグリセリド16：0

2.0mg/mL 16：0遊離脂肪酸

0.2mg/mLジ16：0混合異性体 (1, 2-ジアシルグリセロール及び1, 3-ジアシルグリセロール)

0.2mg/mL 3-モノアシルグリセロール16：0

0.2mg/mL 2-モノアシルグリセロール16：0

各々のサンプルについて、2-magピークを含む画分をコントロールド・タイムド・イベント・リレー (controlled timed events relays) の方法により自動的に集める。検出器をコレクターのエミッターと同期させるのに時間遅延を用いる。2-magピークを集め、それらの画分を室温で一晩蒸発させる。

sn-2組成の結果はアシル移動の最小化に依存する。クロマトグラフィーにおける1-モノアシルグリセロール及び／又は3-モノアシルグリセロールピークの出現は、アシル移動が生じていることを意味する。

4. 誘導体化

全油を誘導体化するため、1.0mgの抽出油全体を秤量して12×32mmクリンブキャップ・バイアルに入れた。その後、1mLのトルエンを添加した。次に、このサンプルを渦巻き攪拌し、誘導体化のために50 μ Lアリコートを取り出した。

乾燥した2-magサンプルに50 μ Lのトルエンを添加した。全油及び2-mag画分に1

05 μ Lの8.76重量% H_2SO_4/CH_3OH を添加する。キャップをきつく締め、サンプルを95℃で1時間還流させた。サンプルを冷却し、500 μ Lの水に10w/v%のNaCl及び60 μ Lのヘプタンを添加した。有機層を取り出し、12×32mmクリンブキャップ・バイアルに挿入した。

5. GLC分析

スプリット/スプリットレス・キャピラリは導入口、FID検出器、6890シリーズ・オートサンプラー及び3392A Alpha Omegaインテグレーターを備えるHewlett Packardモデル6890 GCを、キャピラリーカラムに対して以下のように設定する：

A. Supelco Omegawax 250、30m長、0.25mm内径、0.25 μ m膜厚

注入口：	260℃
検出器：	270℃
初期温度：	170℃
初期時間：	1.5分
速度：	30度/分
最終温度：	245℃
最終時間：	6.5分
注入容量：	1.5 μ L
ヘッド圧：	25psi
スプリット比：	30
キャリアガス：	He
補給(make up)ガス：	N ₂
FIDガス：	H + 空気

脂肪酸メチルエステルの組成パーセントをモルパーセントとして算出する。12未満の炭素鎖長については、理論的又は経験的レスポンス・ファクターを面積パーセントの算出において用いることが望ましい。

6. 計算

各sn-1及びsn-3位の各アシル基の平均分布を算出した。

平均sn-1及びsn-3組成 = (3WO組成 - MAG組成) / 2

WO = 全油

MAG = モノアシルグリセロール

この分析の結果が表14に提示されている。GLA及び $\Delta^{6,9}18:2$ はsn-2及びsn-1, 3位の間で均等に分布する。この分析は、sn-1対sn-3位の脂肪酸を区別することができない。

表14

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2	18:3_Δ6,9,12	8:3	18:4	20:0	20:1
対照											
sn2 組成	1.23	0.15	0.37	64.77	0.00	29.45	0.06	2.01	0.00	0.21	0.57
全油組成	4.33	0.20	3.32	69.29	0.18	18.51	0.00	1.35	0.06	0.91	1.17
平均 sn1, sn3 組成 *	5.88	0.23	4.80	71.55	0.27	13.04	-0.03	1.02	0.09	1.26	1.47
5538-19											
sn2 組成	1.65	0.27	4.12	57.21	5.61	14.55	12.45	1.38	0.32	0.43	1.00
全油組成	5.44	0.33	4.09	57.51	4.53	10.57	13.16	1.03	0.50	1.07	1.07
平均 sn1, sn3 組成 *	7.34	0.36	4.08	57.66	3.99	8.58	13.52	0.86	0.59	1.39	1.11
5538-29											
sn2 組成	1.24	0.27	1.56	56.35	6.35	17.85	12.99	1.60	0.38	0.14	0.40
全油組成	4.96	0.32	3.73	54.92	4.99	12.11	13.66	1.10	0.50	0.99	1.11
平均 sn1, sn3 組成 *	6.82	0.35	4.82	54.21	4.31	9.24	14.00	0.85	0.56	1.42	1.47
*各アナライトにつき、mag と全油組成から算出。											

実施例14

トランスジェニック植物の脂肪酸組成

Δ5及びΔ6トランスジェニック植物をそれらの脂肪酸含量について分析した。

以下のプロトコルを油の抽出に用いた：

1. 約400mgの種子を、各々のサンプルについて2回秤量した。

2. これらの種子を乳鉢及び乳棒で粉碎した。この乳鉢及び乳棒を3mlの(2:1) (v:v) CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{MeOH}$ で2回すすいだ。さらに6ml (2:1) を20mlガラスバイアルに加えた(油を合計12ml 2:1中に抽出)。

3. サンプルを渦巻き攪拌し、オービタル・シェーカー上に時折攪拌しながら2時間置いた。

4. 5mlの1M NaCl を各サンプルに添加した。サンプルを渦巻き攪拌した後、遠心機において2000rpmで5分間回転させた。パスツールピペットを用いて下相を抜き出した。

5. 上相をさらに5mlで再抽出した。サンプルを渦巻き攪拌した後、遠心機において2000rpmで5分間回転させた。パスツールピペットを用いて下相を抜き出し、前の下相に添加した。

6. CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{MeOH}$ を、窒素下で、気化冷却(evaporative cooling)を用いて蒸発させた。抽出油を収容するバイアルを窒素の下で密封した。各々のサンプルについて120mg-160mgの油を抽出した。

GC-MS分析のため、脂肪酸メチルエステルを適切な容量のヘキサンに溶解し、30m \times 0.32mm内径、Omegawax 320溶融シリカキャピラリーカラム (Supelco, Bellefonte, PA) 及びHewlett-Packard 5972シリーズ質量選択検出器 (mass selective detector) を備えるHewlett-Packard 5890 Series II Plusガスクロマトグラフィー (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) を用いて分析した。質量スペクトルを、MS Chem Station (#G1036A) (Hewlett Packard) を用いてNIST/EPA/NIH Chemical Structure Databaseにおける質量スペクトルと比較することにより解釈した。

トランスジェニック系統5531-6を2回 (A、B) 分析し、対照系統LP004-6

と比較した。脂肪酸プロファイルの結果を表15に示す。

トランスジェニック系統5538-19を2回 (A、B) 分析し、対照系統LP004-6と比較した。脂肪酸プロファイルの結果を表16に示す。

表15
脂肪酸プロフィール

	対照	対照	トランスジェニック	トランスジェニック
	LP004-6A	LP004-6B	5531-6A	5531-6B
	LRL-2043	LRL-2044	LRL-2042	LRL-2045
	0010102.d	0010103.d	0010101.d	0010104.d
C12:0				
C13:0				
C14:0		0.053		0.061
C14:1				
C15:0 異性体				
C15:0				
C16:0	4.107	4.034	4.257	4.224
C16:1	0.181	0.173	0.200	0.199
C16:2	0.061	0.065	0.081	0.060
C17:0				
C16:3	0.244	0.246	0.155	0.151
C16:4				
C18:0	2.608	2.714	3.368	3.417
C18:1w9	65.489	66.454	59.529	59.073
C18:1w7	2.297	2.185	2.388	2.393
C18:2 5,9			6.144	6.269
C18:2w6	19.828	18.667	18.872	19.059
C18:3 5,9,12			0.469	0.496
C18:3w6		0.060		
C18:3w3	1.587	1.578	1.428	1.418
C18:4w6				
C18:4w3				
C20:0	0.962	0.998	1.009	1.022
C20:1w11	1.336	1.335	1.058	1.065
C20:1w9				
C20:1w7			0.076	0.080
C20:2w6	0.073	0.073		0.052
C20:3w6				

表15

脂肪酸プロフィール

	対照	対照	トランスジェニック	トランスジェニック
	LP004-6A	LP004-6B	5531-6A	5531-6B
	LRL-2043	LRL-2044	LRL-2042	LRL-2045
	001f0102.d	001f0103.d	001f0101.d	001f0104.d
C20:4w6				
C20:3w3				
C20:4w3				
C20:5w3				
C22:0(1.000)	0.542	0.558	0.463	0.467
C22:1w11		0.038		
C22:1w9				
C22:1w7		0.034		
C21:5				
C23:0		0.029		
C22:4w6				
C22:5w6				
C22:5w3				
C24:0	0.373	0.391	0.280	0.283
C22:6w3	0.314	0.317	0.223	0.212
C24:1w9				
合計	100.00	100.00	100.00	100.00

表16
脂肪酸プロフィール

	5538-19A	5538-19B	LP004-6A	LP004-6B
	トランスジェニック	トランスジェニック	対照	対照
	LRL-2166	LRL-2167	LRL-2168	LRL-2169
C6:0	0.004	0.005		
C8:0	0.007	0.007	0.004	0.005
C10:0	0.012	0.012	0.008	0.008
C12:0	0.020	0.020	0.011	0.012
C13:0				
C14:0	0.099	0.108	0.050	0.050
C14:1w5				
C15:0	0.059	0.068	0.017	0.019
C16:0	5.272	5.294	4.049	4.057
C16:1	0.350	0.417	0.197	0.208
C16:2	0.199	0.187	0.076	0.077
C17:0	0.092	0.089	0.078	0.077
C16:3	0.149	0.149	0.192	0.198
C16:4		0.010		
C18:0	3.815	3.771	2.585	2.638
C18:1	57.562	57.051	68.506	68.352
C18:2 (6,9)	4.246	4.022		
C18:2w6	10.900	11.589	19.098	19.122
C18:2w3	0.020	0.008	0.008	0.009
C18:3w6	12.565	12.595	0.013	0.015
C18:3w3	1.084	1.137	1.501	1.542
C18:4	0.017	0.013	0.011	0.008
C18:4	0.028	0.024		
C20:0	1.138	1.104	0.937	0.943
C20:1	1.115	1.085	1.330	1.327
C20:2w6	0.150	0.143	0.068	0.071
C20:3w6	0.026	0.025	0.014	0.012
C20:4w6				
C20:3w3				

表16
脂肪酸プロフィール

	5538-19A	5538-19B	LP004-6A	LP004-6B
	トランスジェニック	トランスジェニック	対照	対照
	LRL-2166	LRL-2167	LRL-2168	LRL-2169
C20:4w3				
C20:5w3				
C22:0	0.506	0.484	0.535	0.539
C22:1	0.017	0.020	0.032	0.032
C21:5		0.040	0.030	0.031
C22:4w6	0.038	0.064	0.015	0.014
C22:5w6				
C22:5w3	0.023	0.018	0.021	0.017
C24:0	0.352	0.321	0.353	0.362
C22:6w3	0.009			
C24:1w9	0.129	0.121	0.260	0.255
合計	100.00	100.00	100.00	100.00

実施例15

交雑により達成される、アブラナ (*b. napus*) における

Δ^6 及び Δ^{12} デサチュラーゼの組み合わせ発現

Δ^6 又は Δ^{12} デサチュラーゼのいずれかを含む植物を交雑させ、個々のF₁半種子を脂肪酸組成についてGCにより分析した。そのような交雑種の1つからのデータを表17に示す。この交雑のための親は5538-LP004-25-2-25 (Δ^6 発現体) 及び5542-SP30021-10-16 (Δ^{12} 発現体) であった。正逆交雑(reciprocal crosses)を作製した。各々の25個の独立F₁種子の結果を表に示す。交雑種は示される最初の親が雌性であるように記述される。交雑種の組の両者からほぼ同じ結果が得られた。親と比較すると、 $\Delta^{6,9}18:2$ は減少し、GLAは増加した。その上、 $\Delta^{9,12}18:2$ の量もほとんどのF₁において増加する。これらはF₁種子であり、各々のデサチュラーゼの1組のみを含むことに注意されたい。先の世代及び各デサチュラーゼについてホモ接合である結果物(event)の選択においては、得られるF

2 GLA量はさらに高いものであり得る。

交雑による組み合わせ形質は、ある状況において1つのT-DNA上で形質を組み合わせるのに好ましいものであり得る。特に、両遺伝子が同じプロモーター（この場合にはナピン）で駆動される場合には、プロモーターの静止化を発動することが複数のcDNAを1つの構築体に配することよりもこのアプローチに好ましいものであり得る。

あるいは、幾つかの場合においては、1つのT-DNA上で複数のcDNAを組み合わせたことが選り抜きの方法であり得る。これらの結果を表17に示す。

表17

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 11	20:1
5538-LP004-25-2-25	4.23	0.13	2.4	61.78	8.77	6.34	11.58	0.92	0
5542-SP30021-10-16	4.09	0.1	2.03	38.4	0	41.88	0	11.06	0.02 0.75 1.03
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.9	0.04	2.31	38.58	0	27.91	20.94	2.67	0.65 0.92 1.28
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.5	0.04	1.88	36.24	0	28.68	22.64	3.36	0.85 0.78 1.32
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.61	0.03	1.98	38.36	0	29.48	19.95	3.06	0.68 0.79 1.38
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.95	0.04	1.86	38.65	0	28.08	20.81	2.92	0.75 0.76 1.42
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	4.26	0.05	2.44	40.25	0.01	28.81	18.08	2.74	0.53 0.88 1.24
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	4.13	0.04	2.33	34.48	0	26.73	26.2	2.32	0.75 0.9 1.27
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.8	0.04	2.15	38.34	0	28.95	20.64	2.63	0.65 0.81 1.3
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.96	0.05	1.59	36.43	0	29.05	21.85	3.47	0.86 0.68 1.32
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	4.04	0.04	2.5	37.75	0	27.23	22.89	1.95	0.55 0.99 1.26
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.53	0.04	1.8	34.88	0	29.17	23.42	3.42	0.9 0.74 1.3
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.43	0.04	1.89	37.12	0	29.52	20.91	3.35	0.8 0.79 1.35
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.58	0.03	2.56	39.54	0	28.81	19.34	2.44	0.54 0.98 1.34
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.53	0.03	2.33	39.26	0	29.07	19.5	2.61	0.59 0.91 1.37
(5538-LP004-25-2-25 X 6642-SP30021-10-16)	3.4	0.02	2.41	45.53	0	28.94	13.71	2.51	0.37 0.91 1.44

表17

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9 ₁₂	18:3_Δ9,12 ₁₁	18:4	20:0	20:1
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.49	0.03	2.57	40.95	0	28.52	17.97	2.63	0.58	0.99	1.43
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.65	0.04	2.11	36.02	0	29.13	20.53	2.85	0.66	0.86	1.33
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.97	0.03	1.99	34.95	0.01	27.15	25.71	2.38	0.79	0.81	1.38
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.81	0.05	1.46	38.3	0	31.51	17.57	3.83	0.75	0.61	1.33
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.98	0.05	2.03	37.14	0	30.09	20.28	2.79	0.72	0.8	1.36
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	4.03	0.04	2.52	42.9	0	27.79	16.56	2.64	0.54	0.9	1.29
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	4.03	0.04	2.27	40.72	0	29.37	17.56	2.53	0.53	0.86	1.35
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.98	0.04	2.61	39.91	0	28.06	19.15	2.69	0.6	0.96	1.26
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	3.73	0.03	1.89	40.22	0	29.44	18.21	3	0.67	0.73	1.39
(5538-LP004-25-2-25 X 5542-SP30021-10-16)	4.02	0.04	2.14	42.58	0	30.36	15.18	2.43	0.42	0.82	1.3
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.14	0.06	2.23	30.57	0	30.38	25.47	3.12	0.91	0.9	1.29
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.05	0.07	1.7	37.03	0.04	32.1	15.97	5.38	0.96	0.69	1.28
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.01	0.07	1.58	38.02	0.05	33.65	13.92	5.15	0.89	0.66	1.28
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.07	0.06	2.01	31.53	0.05	31.13	23.09	3.94	1.1	0.83	1.28
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.03	0.05	1.94	31.88	0	30.98	23.71	3.45	0.99	0.82	1.3
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	3.92	0.06	1.71	35.77	0.03	33.15	16.39	5.28	0.98	0.68	1.32
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.09	0.08	1.57	34.6	0.03	33.73	16.73	5.48	0.99	0.66	1.28

表17

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2_Δ6,9	18:2_Δ9,12	18:3_Δ6,9, 12	18:3_Δ9,12, 11	20:1
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	3.94	0.07	1.59	34.03	0.04	31.35	19.76	5.29	1.22 0.67 1.28
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.13	0.06	1.85	31.44	0.06	31.28	23.77	3.52	1.04 0.79 1.22
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.14	0.06	1.96	31.11	0.04	31.88	23.3	3.6	1.01 0.82 1.27
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	3.98	0.07	1.58	35.06	0	32.06	18.1	5.33	1.12 0.67 1.28
(5542-SP30021-10-18 X 5538-LP004-25-2-25)	3.89	0.06	1.59	32.51	0.05	29.44	22.91	5.33	1.54 0.67 1.25
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4	0.07	1.89	32.1	0.05	30.49	22.77	4.68	1.32 0.75 1.26
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.06	0.05	1.93	30.77	0.07	28.37	27.21	3.37	1.19 0.84 1.25
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.1	0.06	1.9	31.77	0.05	32.33	22.03	3.92	0.98 0.78 1.27
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	3.94	0.07	1.67	34.74	0.03	33.63	17.1	5.16	0.99 0.68 1.26
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	3.71	0.06	1.65	33.05	0	33.22	19.73	4.7	1.07 0.68 1.39
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	3.84	0.06	1.71	34.16	0.04	34.52	16.74	5.18	0.97 0.68 1.34
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4	0.07	1.66	34.97	0.07	33.08	17.07	5.27	1.1 0.67 1.28
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.16	0.06	1.99	35.44	0.05	31.89	18.95	3.68	0.89 0.81 1.29
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.05	0.08	1.46	33.49	0	31.96	18.81	8.2	1.32 0.61 1.28
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.2	0.06	1.93	35.06	0.06	33.69	17.38	4	0.86 0.78 1.21
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.07	0.06	1.74	36	0.06	32.18	17.86	4.32	0.93 0.73 1.27
(5542-SP30021-10-16 X 5538-LP004-25-2-25)	4.11	0.05	2.24	29.64	0.04	28.64	27.94	3.06	1.12 0.97 1.26

実施例16

ダイズにおけるM. アルピナ・デサチュラーゼの発現

M. アルピナ・デサチュラーゼは、以下の発現構築体を用いることにより、ダイズにおいてGLA及び他のPUFAの産生を駆動させるのに用いることができる。アグロバクテリウム感染又は粒子銃が外来性DNAをダイズゲノムに挿入することができる2つの手段である。粒子銃形質転換は米国特許第5,503,998号に開示されている。植物はグリフォセート耐性マーカー (4,971,908) を用いて選択することができる。ダイズのアグロバクテリウム形質転換は当業者にとって確立されたものである。

種子特異的発現のため、デサチュラーゼcDNAのコーディング領域を、Glycine max α 型 β コングリシニン貯蔵タンパク質遺伝子の5' 調節領域の制御下に置く。用いることができるこの特定の領域はgi 169928 (Doyle, J.J., Schuler, M.A., Godette, W.D., Zenger, V., Beachy, R.N., and Slightom, J.L., 1986 J. Biol. Chem. 261(20), 9228-9238) のヌクレオチド78-921である。用いることができる3' 調節領域はエンドウマメリブ羅斯1, 5ビスホスフェートカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ小サブユニット (rbcS) 遺伝子に由来するものである。用いられる特定の配列は、gi 169145 (Hunt, A.G. 1988 DNA 7:329-336) のヌクレオチド1-645である。

ダイズ種子はアブラナ属よりも多くの18:2、及び、おそらくは多くの内在性 Δ 12デサチュラーゼ活性を有するため、最適GLA量の達成に対するMortierella Δ 12デサチュラーゼの効果を以下のように試験することができる。 Δ 6 cDNAを含む構築体は、 Δ ^{6,9}18:2がGLAと共に産生されるかどうかを調べるのに用いることができる。 Δ 12デサチュラーゼを含む構築体は、ダイズにおいて18:2の量を増加させることが可能かどうかを調べるのに用いることができる。 Δ 6及び Δ 12デサチュラーゼの両者を含む構築体は、最適量のGLAを産生させるのに用いることができる。その代わりに、必要であれば、単一のデサチュラーゼの各々を含む植物を交雑させてそれらの遺伝子を組み合わせることができる。

Δ 5デサチュラーゼを単独で、又は Δ 12及び/又は Δ 6デサチュラーゼと組み

合わせて発現させるために、類似の構築体を作製することができる。

実施例17

ヒトデサチュラーゼ遺伝子配列

長鎖多不飽和脂肪酸生合成に関与している可能性のあるヒトデサチュラーゼ遺伝子配列を、ヒトcDNA配列とMortierella alpinaのデサチュラーゼ遺伝子配列との相同性に基づいて単離した。膜結合デサチュラーゼに保存されていることが知られている3種の保存「ヒスチジンボックス」が認められた。他のいくつかの膜結合デサチュラーゼのように、最終HXXHヒスチジンボックスモチーフがQXXHであることが判った。推定上のヒトデサチュラーゼのアミノ酸配列は、M. alpina $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$ 、及び $\Delta 12$ デサチュラーゼとの相同性を示した。

M. alpina $\Delta 5$ -デサチュラーゼ及び $\Delta 6$ デサチュラーゼcDNA配列を用いて、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, California 94304のLifeSeqデータベースをサーチした。 $\Delta 5$ デサチュラーゼ配列は、断片1) アミノ酸番号1~150、2) アミノ酸番号151~300、及び3) アミノ酸番号301~446に分けられた。 $\Delta 6$ デサチュラーゼ配列は、3つの断片、1) アミノ酸番号1~150、2) アミノ酸番号151~300、及び3) アミノ酸番号301~457に分けられた。これらのポリペプチド断片について、"tblastn"アルゴリズムを用いてデータベースを検索した。このアルゴリズムは、タンパク質のクエリー配列を、(両鎖の)6種の全てのリーディングフレームに動的に翻訳されたヌクレオチド配列データベースと比較するアルゴリズムである。

M. alpina $\Delta 5$ 及び $\Delta 6$ のポリペプチド断片2及び3は、表18に概要を示したCloneID配列と相同性を有する。このCloneIDはIncyte LifeSeqデータベースからの個々の配列を示す。"tblastn"の結果を検討した後、異なるCloneID番号について、 ≥ 50 の厳密性(Stringency)、及び ≤ 100 の積スコア(Productscore)のデフォルトの設定でクローン情報(Clone Information)を検索した。クローン情報結果(Clone Information Results)は、ClusterID、CloneID、Library、HitID、Hit Descriptionを含む情報を表示する。選択時に、ClusterID番号はそのClusterIDに属する全てのクローンのクローン情報を表示する。Assembleコマンドにより、そのClusterIDを含む全てのCloneIDが集められる。以下のデフォルト設定は、GCG(Genetic Computer Group, University of Wisconsin

Biotechnology Center, Madison, Wisconsin 53705) Assemblyのために用いられたものである。

ワードサイズ(Word Size):7

最少重複(Minimum Overlap):14

厳密性(Stringency):0.8

最少同一性(Minimum Identity):14

最大ギャップ(Maximum Gap):10

ギャップ重み(Gap Weight):8

長さ重み(Length Weight):2

GCG Assembly Resultsは、CloneID内の配列情報に基づいて生成されたコンティグを表示した。コンティグはこれらの配列間の相同な領域に基づくDNA配列のアライメントである。コンティグ内においてアライメントされたDNA配列に基づいて新たな配列(コンセンサス配列)を生成した。CloneIDを含むコンティグが同定され、コンセンサス配列の曖昧な部位はCloneIDのアライメント(配列番号31~配列番号35参照)に基づいて編集し、最も可能性の高い配列を生成した。この手順を表18に挙げた6種の全てのCloneIDについて繰り返した。これにより5種のユニークなコンティグが生成された。5種のコンティグの編集されたコンセンサス配列を、Sequencherソフトウェアプログラム(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan 48105)にインポートした。これらのコンセンサス配列を組み立てた。コンティグ2511785はコンティグ3506132と重複しており、この新たなコンティグは2535(配列番号37)と称する。Sequencherプログラムからのコンティグを、GCGのSequence Analysisソフトウェアパッケージにコピーした。

6種の全てのリーディングフレームにおいて各コンティグをタンパク質配列に翻訳した。M. alpina Δ 5(MA29)及び Δ 6(MA524)配列を、FastAサーチ(クエリー配列及び同じ種類(核酸またはタンパク質)の配列群との間の類似性についてのPearson and Lipmanサーチ)を用いて、翻訳された各コンティグと比較した。これらの配列間の相同性は、各コンティグのオープンリーディングフレームを示唆

するものである。コンティグ2535及び3854933に対するM. alpina Δ 5及び Δ 6の間の相同性を利用して、253538aと称する最終コンティグを形成した。図9は、最終コンティグ253538aとMA29とのFastAマッチであり、図10は、最終コンティグ253538aとMA524とのFastAマッチである。種々のコンティグのDNA配列を配列番号31～配列番号37に示す。種々のペプチドの配列を配列番号38～配列番号44に示す。

2つのコンティグを合わせることによりオープンリーディングフレームが生成されるが、コンティグ2535はこのコンティグの最初の部分にコンティグ3854933と一致しないユニークな配列が存在することを示している。従って、これらのコンティグがヒト遺伝子のような独立したデサチュラーゼから生成されたものである可能性がある。

コンティグ253538aは、432個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを含む。このオープンリーディングフレームはGln(CAG)から始まり、終止コドン(TGA)で終わる。コンティグ253538aはM. alpina Δ 5及び Δ 6配列の双方とアライメントされ、これはこのコンティグが前記デサチュラーゼの何れかで有り得るとともに、互いに相同性を共有する他の公知のデサチュラーゼであり得ることを示唆している。表18に挙げた個々のコンティグ並びに中間コンティグ2535及び最終コンティグ253538aを利用してヒトデサチュラーゼの完全な遺伝子を単離することができる。

ヒトデサチュラーゼの使用

これらのヒト配列は、先の実施例で説明した手順を用いて酵母及び植物で発現することができる。哺乳動物細胞及びトランスジェニック動物での発現については、これらの遺伝子は優位コドンバイアスを与え得る。さらに、これらの配列は、他の生物由来の関連デサチュラーゼ遺伝子を単離するために用いることもできる。

表 18

デサチュラーゼの部分	LifeSeq データベースからの CloneID	キーワード
151～300 Δ 5	3808675	脂肪酸デサチュラーゼ

301~446 $\Delta 5$	354535	$\Delta 6$
151~300 $\Delta 6$	3448789	$\Delta 6$
151~300 $\Delta 6$	1362863	$\Delta 6$
151~300 $\Delta 6$	2394760	$\Delta 6$
301~457 $\Delta 6$	3350263	$\Delta 6$

実施例18

M. alpina $\Delta 5$ 及び $\Delta 6$ デサチュラーゼの相同体の同定

推定上の $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする核酸配列を、Ma29のアミノ酸100-446をクエリーとして用いたNCBIによる発現した配列タグのデータベースのTBLASTNサーチにより同定した。Ma29配列の切断された一部分を用いて、デサチュラーゼのN末端におけるチトクロームb5部分に基づく相同性を選択することを回避した。Dictyostereum discoideum(受託番号C25549)からのestの推定アミノ酸配列はMa29に対して非常に有意な相同性を示し、そしてMa524に対してもそれより低い程度であるが依然として有意な相同性を示す。このDNA配列を配列番号45として示す。アミノ酸配列を配列番号46として示す。

実施例19

他のPUFA産生生物におけるM. alpina $\Delta 5$ 及び $\Delta 6$ 相同体の同定

PUFAの産生に関与するデサチュラーゼを得るために、Phaeodactylum tricornutum種から単離された全RNAからcDNAライブラリーを構築した。プラスミドベースのcDNAライブラリーを、市販のキット(GIBCO-BRL)をその使用説明書に従って用いて、pSPORT1(GIBCO-BRL)中に構築した。無作為なcDNAクローンを配列決定し、推定される $\Delta 5$ または $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする核酸配列を、データベースのBLASTサーチ及びMa29及びMa524配列との比較によって同定した。

Ma29及びMa524と相同性を有する1種のクローンがPhaeodactylumライブラリーから同定された。これを144-011-B12と称する。このDNA配列を配列番号47として示す。アミノ酸配列を配列番号48として示す。

実施例20

他のPUFA産生生物におけるM. alpina $\Delta 5$ 及び $\Delta 6$ 相同体の同定

PUFAの産生に関与するデサチュラーゼを得るために、Schizochytrium種から単

離された全RNAからcDNAライブラリーを構築した。プラスミドベースのcDNAライブラリーを、市販のキット(GIBCO-BRL)をその使用説明書に従って用いて、pSPOR T1(GIBCO-BRL)中に構築した。無作為なcDNAクローンを配列決定し、推定される $\Delta 5$ または $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする核酸配列を、データベースのBLASTサーチ及びMa29及びMa524配列との比較によって同定した。

Ma29及びMa524と相同性を有する1種のクローンがSchizochytriumライブラリーから同定された。これを81-23-C7と称する。このクローンは約1kbのインサートを含む。ユニバーサルフォワード及びリバーシークエンシングプライマーを用いてクローンの各末端から部分配列を得た。フォワードプライマーから得たDNA配列を配列番号49として示す。そのペプチド配列を配列番号50として示す。リバーシークエンシングプライマーから得たDNA配列を配列番号51として示す。リバーズプライマーから得られたアミノ酸配列を配列番号52として示す。

実施例21

栄養組成物

上記実施例のPUFAは、様々な栄養補助剤、乳幼児用配合物、栄養代用物やその他の栄養液に用いることが出来る。

I 乳幼児用配合物

A. Isomil®鉄分含有大豆配合物

用法：牛乳にアレルギーや不耐症を持つ乳幼児、小児、成人の飲用。ラクトースを避けなければならない障害（ラクターゼ欠損症、ラクトース不耐症、ガラクトース血症）の患者の食餌

特徴：

- ・大豆タンパク質単離物により牛乳由来タンパク質へのアレルギー、過敏症の症状を防ぐ
- ・ラクトース非含有の組成がラクトース性の下痢を防ぐ
- ・低いオスモル濃度（240mOsm/kg水）が浸透圧性の下痢の危険を抑える
- ・2種の炭水化物（コーンシロップ、ショ糖）が炭水化物の吸収を促進するように設計されており、弱った腸の吸収力を超過する危険を抑える

- ・ 100カロリーあたり1.8mgの鉄分（硫酸第一鉄として）が鉄分欠乏症を防ぐ
- ・ 推奨量のビタミン、ミネラル
- ・ 植物油により推奨量の脂肪酸を供給
- ・ 乳白色、牛乳と同程度のコンシステンシー、心地よい香り

成分：(Pareve[®]) 85%水、4.9%コーンシロップ、2.6%糖（ショ糖）、2.1%大豆油、

1.9%大豆タンパク質単離物、1.4%ココナッツオイル、0.15%クエン酸カルシウム、0.11%リン酸カルシウム三塩基、クエン酸カリウム、リン酸カリウム一塩基、塩化カリウム、モノグリセリド、ジグリセリド、大豆レシチン、カラゲナン、アスコルビン酸、L-メチオニン、塩化マグネシウム、リン酸カリウム二塩基、塩化ナトリウム、塩化コリン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウム、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

B. Isomil[®] DF 整腸用大豆配合物

用法：乳幼児の下痢時食餌管理における短期間の食餌

特徴：

- ・ 第一乳幼児用配合物は特に整腸用に添加された大豆繊維由来の食物繊維を含む
- ・ 乳幼児の中程度から重度の下痢において、ゆるく水っぽい便の期間を短縮することが臨床的に示されている
- ・ 乳幼児の栄養学的要求を完全に満たしている
- ・ 大豆タンパク質単離物と添加L-メチオニンは乳幼児の必要とする全ての必須アミノ酸量に合致またはそれを上回っている

- ・ ラクトース非含有の配合がラクトース性下痢を防ぐ
- ・ 低いオスモル濃度（240mOsm/kg水）が浸透圧性の下痢の危険を抑える
- ・ 2種の炭水化物（コーンシロップ、ショ糖）が炭水化物の吸収を促進するように設計されており、弱った腸の吸収力を超過する危険を抑えている

・アメリカ小児科学会栄養学委員会の推薦値、乳幼児調合乳法の要求値を満たすかまたは上回るビタミンとミネラルのレベル

・100カロリーあたり1.8mgの鉄分（硫酸第一鉄として）が鉄分欠乏症を防ぐ

・植物油により推奨量の脂肪酸を供給

成分：(Pareve[®]) 86%水、4.8%コーンシロップ、2.5%糖（シヨ糖）、2.1%大豆油、

2.0%大豆タンパク質単離物、1.4%ココナッツオイル、0.77%大豆繊維、0.12%クエン酸カルシウム、0.11%リン酸カルシウム三塩基、0.10%クエン酸カリウム、塩化カリウム、リン酸カリウム一塩基、モノグリセリド、ジグリセリド、大豆レシチン、カラゲナン、塩化マグネシウム、アスコルビン酸、L-メチオニン、硫酸カリウム二塩基、塩化ナトリウム、塩化コリン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウム、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

C. Isomil[®] SF 鉄分含有シヨ糖非含有大豆配合物

用法：牛乳のタンパク質に対するアレルギーや過敏症またはシヨ糖への不耐症を持つ乳幼児、小児、成人の飲用。ラクトース、シヨ糖を避けなければならない疾患を有する患者の食餌。

特徴：

・大豆タンパク質単離物により牛乳由来タンパク質へのアレルギー、過敏症の症状を防ぐ

・ラクトース非含有の配合がラクトース性の下痢を防ぐ（炭水化物は Polycose[®] グルコースポリマー）

・シヨ糖不耐性患者のためにシヨ糖非含有

・低いオスモル濃度（180mOsm/kg水）が浸透圧性の下痢の危険を抑える

・100カロリーあたり1.8mgの鉄分（硫酸第一鉄として）が鉄分欠乏症を防ぐ

・推奨量のビタミン、ミネラル

・植物油により推奨量の脂肪酸を供給する

・乳白色、牛乳と同程度のコンシステンシー濃度、心地よい香り

成分：(Pareve®) 75%水、11.8%加水分解コーンスターチ、4.1%大豆油、4.1%大

豆タンパク質単離物、2.8%ココナッツオイル、1.0%改質コーンスターチ、0.38%リン酸カルシウム三塩基、0.17%クエン酸カリウム、0.13%塩化カリウム、モノグリセリド、ジグリセリド、大豆レシチン、塩化マグネシウム、アスコルビン酸、L-メチオニン、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、塩化コリン、カラゲナン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウム、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

D. Isomil® 20 鉄分含有大豆配合物、そのまま摂取可能、20 Cal/fl oz

用法：大豆食餌が望ましい場合

成分：(Pareve®) 85%水、4.9%コーンシロップ、2.6%糖（ショ糖）、2.1%大豆油、

1.9%大豆タンパク質単離物、1.4%ココナッツオイル、0.15%クエン酸カルシウム、0.11%リン酸カルシウム三塩基、クエン酸カリウム、リン酸カリウム一塩基、塩化カリウム、モノグリセリド、ジグリセリド、大豆レシチン、カラゲナン、アスコルビン酸、L-メチオニン、塩化マグネシウム、硫酸カリウム二塩基、塩化ナトリウム、塩化コリン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、リボフラビン、塩

酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウム、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

E. Similac®乳幼児用配合物

用法：乳幼児用配合物が必要なとき：一歳児になる前に母乳を中止する決定がなされたとき、母乳の補助が必要なとき、あるいは母乳を使用していない場合に通常の食餌として

特徴：

- ・良好な成長に適した質、量のタンパク質、熱変性され乳性腸失血の危険を低減する
- ・植物油混合物（二回ホモゲナイズしたもの）由来の脂肪が、容易に吸収される必須のリノール酸を供給する
- ・ラクトースとしての炭水化物中の比率が母乳におけるものと類似する
- ・低腎溶質負荷が発達中の器官の負担を最小化する
- ・粉末、濃縮液体、及びそのまま摂取できるものの三種の形態

成分：(e-D) 水、脱脂乳、ラクトース、大豆油、ココナッツオイル、モノグリセリド、ジグリセリド、大豆レシチン、アスコルビン酸、カラゲナン、塩化コリン、タウリン、D-イノシトール、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、硫酸第一鉄、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、フィロキノン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウム、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

F. Similac®NeoCare 鉄分含有未熟児配合物

用法：退院後の未熟児の特別な栄養要求用。Similac NeoCareは、未熟児の成長を追いつかせ、発達を支持するために必要なカロリー、タンパク質、ビタミン、及びミネラル分を追加した、栄養学的に完全な配合物である。

特徴：

- ・カロリーとビタミンの補助の必要性を低減する。標準期間配合物 (20Cal/fl oz) よりも多いカロリー (22Cal/fl oz)
- ・中鎖トリグリセリド (MCTオイル) を配合した高吸収性混合脂肪が未熟児の特別な消化の要求に答えるのを助ける
- ・100カロリーあたりのより高いレベルのタンパク質、ビタミン、及びミネラル

が、入院時に始められた栄養学的支持を延長する

・骨の石化改良のためのより多くのカルシウムとリン酸

成分：⑨-D 固形コーンシロップ、脱脂乳、ラクトース、乳清タンパク質濃縮物、

大豆油、高オレイン酸ベニバナ油、分画化ココナッツオイル(中鎖トリグリセリド)、ココナッツオイル、クエン酸カリウム、リン酸カルシウム三塩基、炭酸カルシウム、アスコルビン酸、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、タウリン、硫酸第一鉄、 m -イノシトール、塩化コリン、パルミチン酸アスコルビル、 L -カルニチン、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、混合トコフェロール、クエン酸ナトリウム、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、塩化チアミン塩酸塩、パルミチン酸ビタミンA、 β カロテン、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、フィロキノン、ビオチン、亜セレン酸ナトリウム、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

G. Similac Natural Care低鉄分母乳増強剤、そのまま使用可能、24Ca1/fl oz

用法：母乳混合用あるいは低出生体重児に母乳に代替して給餌するために設計

成分：⑨-D 水分、脱脂乳、加水分解コーンスターチ、ラクトース、分画化ココ

ナッツオイル(中鎖トリグリセリド)、乳清タンパク質濃縮物、大豆油、ココナッツオイル、リン酸カルシウム三塩基、クエン酸カリウム、塩化マグネシウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、炭酸カルシウム、モノグリセリド、ジグリセリド、大豆レシチン、カラゲナン、塩化コリン、 m -イノシトール、タウリン、ナイアシンアミド、 L -カルニチン、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、塩化カリウム、パントテン酸カルシウム、硫酸第一鉄、硫酸第二銅、リボフラビン、パル

ミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、ビオチン、葉酸、硫酸マンガン、フィロキノン、ビタミンD₃、亜セレン酸ナトリウム、及びシアノコバラミン

本発明の種々のPUFAは、上記の乳幼児用配合物及び当業者に知られるその他の乳幼児用配合物に代替し及び／またはそれらに添加し得る。

II 栄養配合物

A. ENSURE®

用法：ENSUREは低残渣液体食品で、主として、食事と共に、もしくは食間に使用される経口栄養補助剤として、あるいは適量で食事の代替物として使用されるように設計されたものである。ENSUREはラクトース、グルテンを含まず、低コレストロールダイエットを含む調整食餌療法での使用に適している。主として経口補助剤であるが、チューブでの給餌も可能である。

患者の条件：

- ・調整食餌療法を行っている患者
- ・栄養的に問題のある年配の患者
- ・不本意な減量状態にある患者
- ・病気や手術から回復途上にある患者
- ・低残渣食餌療法を要する患者

成分：

④-D 水分、糖（ショ糖）、マルトデキストリン（コーン）、カゼイン酸カルシウム、カゼイン酸ナトリウム、高オレイン酸ベニバナ油、大豆タンパク質単離物、大豆油、キャノーラ油、クエン酸カリウム、リン酸カルシウム三塩基、クエン酸ナトリウム、塩化マグネシウム、リン酸マグネシウム二塩基、人工香料、塩化ナトリウム、大豆レシチン、塩化コリン、アスコルビン酸、カラゲナン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、ゲランガム、ナイアシンアミド、パント

ン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、葉酸、モリブデン酸ナトリウム、塩化クロム、ビオチン、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム

B. ENSURE® BARS

用法：ENSURE BARSは食事と共にまたは食間に補助的に使用するための完全でバランスの取れた栄養剤である。おいしく、栄養に富む、他のスナック類の代替物を供給する。ENSURE BARSが含むラクトースはバー一本当たり19未満であり、

チョコレートファッジブラウニーフレーバーはグルテンを含まない(ハニーグラハムクランチフレーバーはグルテンを含む)。

患者の条件：

- ・カロリー、タンパク質、ビタミン、及びミネラルを余分に必要とする患者。
- ・十分なカロリー、栄養分を摂取していない人に特に有用。
- ・咀嚼、嚥下が可能な人
- ・ピーナッツアレルギー、または豆類に対する何らかのアレルギーを持つ人には使用不可

成分：

ハニーグラハムクランチー高フルクトースコーンシロップ、大豆タンパク質単離物、ブラウンシュガー、蜂蜜、マルトデキストリン(コーン)、クリスプライス(粉状米、糖分[ショ糖]、塩[塩化ナトリウム]、麦芽)、オートブラン、部分的に水素化された綿実油と大豆油、大豆多糖類、グリセリン、乳清タンパク質濃縮物、ポリデキストロース、フルクトース、カゼイン酸カルシウム、ココアパウダー、人工香料、キャノーラ油、高オレイン酸ベニバナ油、脱脂粉乳、乳清粉末、大豆レシチン、コーンオイル。豆類を加工処理する設備で生産される。

ビタミン及びミネラル：

リン酸カルシウム三塩基、リン酸カリウム二塩基、酸化マグネシウム、塩(塩化ナトリウム)、塩化カリウム、アスコルビン酸、オルトリン酸第二鉄、酢酸 α -

トコフェリル、ナイアシンアミド、酸化亜鉛、パントテン酸カルシウム、グルコン酸銅、硫酸マグネシウム、リボフラビン、 β カロテン、塩酸ピリドキシン、一硝酸チアミン、葉酸、ビオチン、塩化クロム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

タンパク質：

ハニーグラハムクランチータンパク質源は大豆タンパク質単離物と牛乳タンパク質の混合物である。

大豆タンパク質単離物

74%

牛乳タンパク質 26%

脂肪：

ハニーグラハムクランチ-脂肪源は、部分的に水素化された綿実油と大豆油、キャノーラ油、高オレイン酸ベニバナ油、コーン油、大豆レシチンの混合物である。

部分的に水素化された綿実油と大豆油	76%
キャノーラ油	8%
高オレイン酸ベニバナ油	8%
コーン油	4%
大豆レシチン	4%

炭水化物：

ハニーグラハムクランチ-炭水化物源は、高フルクトースシロップ、ブラウンシュガー、マルトデキストリン、蜂蜜、クリスプライス、グリセリン、大豆多糖類、及びオートブランの組合せである。

高フルクトースシロップ	24%
ブラウンシュガー	21%
マルトデキストリン	12%
蜂蜜	11%
クリスプライス	9%
グリセリン	9%
大豆多糖類	7%
オートブラン	7%

C. ENSURE® HIGH PROTEIN

用法：ENSURE HIGH PROTEINは、食餌療法としてカロリー、タンパク質、ビタミン、ミネラルを余分に摂取しなければならない人のために設計された濃縮高タンパク液体食品である。食事と共にまたは食間に経口栄養補助剤として用いることができ、適量で食事代替物としても使用できる。ENSURE HIGH PROTEINはラクトース、グルテンを含まず、一般的な手術や腰部骨折から回復途上にある人々や

圧迫潰瘍の危険がある患者に適している。

患者の条件

- ・一般的な手術や腰部骨折から回復途上にある人々や圧迫潰瘍の危険がある患者
- ・低コレステロール食餌療法を行っている患者のように、カロリー、タンパク質、ビタミン、ミネラルを余分に摂取しなければならない患者

特徴

- ・低飽和脂肪
- ・服用量あたり含有全脂肪6g、5mg未満のコレステロール
- ・豊かでクリーミーな味わい
- ・タンパク質、カルシウム、その他の必須ビタミン、ミネラルの優秀な供給源
- ・低コレステロール食餌療法用
- ・ラクトース非含有、消化しやすい

成分：

パニラシュプリーム：[®]-D 水分、糖（ショ糖）、マルトデキストリン（コーン）、カゼイン酸カルシウム、カゼイン酸ナトリウム、高オレイン酸ベニバナ油、大豆

タンパク質単離物、大豆油、キャノーラ油、クエン酸カリウム、リン酸カルシウム三塩基、クエン酸ナトリウム、塩化マグネシウム、リン酸マグネシウム二塩基、人工香料、塩化ナトリウム、大豆レシチン、塩化コリン、アスコルビン酸、カラゲナン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、ゲランガム、ナイアシニアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、葉酸、モリブデン酸ナトリウム、塩化クロム、ビオチン、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

タンパク質：

タンパク質源は2種の高生物価タンパク質、カゼインと大豆の混合物である。

カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム 85%

大豆タンパク質単離物 15%

脂肪：

脂肪源は3種の油、高オレイン酸ベニバナ油、キャノーラ油、大豆油の混合物である。

高オレイン酸ベニバナ油	40%
キャノーラ油	30%
大豆油	30%

ENSURE HIGH PROTEINの脂肪レベルは、アメリカ心臓学会 (AHA) のガイドラインに合致している。ENSURE HIGH PROTEIN中の6 gの脂肪は全カロリー中の24%を占め、脂肪中の2.6%は飽和脂肪酸、7.9%は多不飽和脂肪酸からのものである。これらの数値は、脂肪由来は全カロリーの30%以下、飽和脂肪酸由来は10%未満、多不飽和脂肪酸由来は10%以下というAHAガイドラインの範囲内である。

炭水化物：

ENSURE HIGH PROTEINはマルトデキストリン及びショ糖の組合せを含む。マイ

ルドな甘さとフレーバーの種類(バニラシュプリム、チョコレートワイヤル、ワイルドベリー、バナナ)、それに加えて、ピーカン、チェリー、イチゴ、レモ

ン、オレンジの VARI-FLAVORS®フレーバーパックは風味への飽きを防ぎ、患者の服用承諾を助ける。

バニラ及びその他のチョコレート以外のフレーバー

ショ糖	60%
マルトデキストリン	40%

チョコレート

ショ糖	70%
マルトデキストリン	30%

D. ENSURE® LIGHT

用法：ENSURE LIGHTは、食事と共にまたは食間に経口栄養補助剤として用いるように設計された低脂肪液体食品である。ENSURE LIGHTはラクトース、グルテンを含まず、低コレステロール食餌療法を含む調整食餌療法における使用に適している。

患者の条件：

- ・適正または過剰体重の患者で、ENSUREと比して50%減の脂肪、20%減のカロリーを含む栄養補助剤の余分な栄養を必要とする患者
- ・適正な食事を取っていない余分な栄養が必要な健康な成人

特徴：

- ・低脂肪、低飽和脂肪
- ・服用量あたり 3 g の全脂肪、5 mg未満のコレステロール
- ・豊かでクリーミーな味わい
- ・カルシウムやその他の必須ビタミン、ミネラルの優秀な供給源
- ・低コレステロール食餌療法用
- ・ラクトース非含有、消化しやすい

成分：

フレンチバニラ：[®]-D 水、マルトデキストリン（コーン）、糖（ショ糖）、カゼイ

ン酸カルシウム、高オレイン酸ベニバナ油、キャノーラ油、塩化マグネシウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、リン酸カリウム二塩基、リン酸マグネシウム二塩基、天然香料、人工香料、リン酸カルシウム三塩基、セルロースゲル、塩化コリン、大豆レシチン、カラゲナン、塩（塩化ナトリウム）、アスコルビン酸、セルロースガム、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、硫酸マンガン、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、塩化チアミン塩酸塩、パルミチン酸ビタミンA、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、塩化クロム、葉酸、モリブデン酸ナトリウム、ビオチン、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

タンパク質：

タンパク質源はカゼイン酸カルシウムである。

カゼイン酸カルシウム 100%

脂肪

脂肪源は高オレイン酸ベニバナ油、キャノーラ油の2種のオイルの混合物であ

る。

高オレイン酸ベニバナ油	70%
キャノーラ油	30%

ENSURE LIGHTの脂肪レベルは、アメリカ心臓学会 (AHA) のガイドラインに合致している。ENSURE LIGHTの3 gの脂肪は全カロリー中の13.5%を占め、脂肪中の1.4%は飽和脂肪酸、2.6%は多不飽和脂肪酸からのものである。これらの数値は、脂肪由来は全カロリーの30%以下、飽和脂肪酸由来は10%未満、多不飽和脂

肪酸由来は10%以下というAHAガイドラインの範囲内である。

炭水化物

ENSURE LIGHTはマルトデキストリンとショ糖の組合せを含む。チョコレートフレーバーはコーンシロップも含む。マイルドな甘さとフレーバーの種類(フレンチバニラ、チョコレートシュプリーム、ストロベリースワール)、それに加えてピーカン、チェリー、イチゴ、レモン、オレンジの VARI-FLAVORS®フレーバーパックは、風味への飽きを防ぎ、患者の服用承諾を助ける。

バニラ及びチョコレート以外のフレーバー

ショ糖	51%
マルトデキストリン	49%

チョコレート

ショ糖	47.0%
コーンシロップ	26.5%
マルトデキストリン	26.5%

ビタミン及びミネラル

ENSURE LIGHTの8-fl-ozの服用量で、24の重要ビタミンとミネラルのRDIの少なくとも25%が供給される。

カフェイン

チョコレートフレーバーは8-fl-ozあたり2.1mgのカフェインを含む。

E. ENSURE PLUS®

用法：ENSURE PLUSは高カロリー、低残渣の液体食品で、カロリーと栄養は余

分に必要だが通常濃度のタンパク質が必要である場合に使用する。主として、食事と共に、もしくは食間に使用する経口栄養補助剤として、あるいは適量で食事

の代替物として設計されたものである。ENSURE PLUSはラクトース、グルテンを含まない。主として経口栄養補助剤であるが、チューブでの給餌も可能である。

患者の条件：

- ・制限容量内で、余分なカロリーと栄養分を必要とし、タンパク質は通常濃度要している患者用
- ・健康的な体重を獲得または維持する必要がある患者用

特徴

- ・豊かでクリーミーな味わい
- ・必須なビタミン、ミネラルの良好な供給源

成分

バニラ :[®]-D 水、コーンシロップ、マルトデキストリン (コーン)、コーン油、カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム、糖(ショ糖)、大豆タンパク質単離物、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、リン酸カルシウム三塩基、大豆レシチン、天然香料、人工香料、クエン酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化コリン、アスコルビン酸、ガラゲナン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸第二銅、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、パルミチン酸ビタミンA、葉酸、ビオチン、塩化クロム、モリブデン酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、亜セレン酸ナトリウム、フィロキノン、シアノコバラミン、及びビタミンD₃

タンパク質

タンパク質源は2種の高生物価タンパク質、カゼインと大豆の混合物である。

カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム	84%
大豆タンパク質単離物	16%

脂肪

脂肪源はコーンオイルである。

コーンオイル

100%

炭水化物

ENSURE PLUSはマルトデキストリンとショ糖の組合せを含む。マイルドな甘さとフレーバーの種類(バニラ、チョコレート、イチゴ、コーヒー、バターピーカン、エッグノッグ)、それに加えてピーカン、チェリー、イチゴ、レモン、オレンジの VARI-FLAVORS® フレーバーパックは、風味への飽きを防ぎ、患者の服用承諾を助ける。

バニラ、イチゴ、バターピーカン、コーヒーフレーバー

コーンシロップ 39%

マルトデキストリン 38%

ショ糖 23%

チョコレート、エッグノッグフレーバー

コーンシロップ 36%

マルトデキストリン 34%

ショ糖 30%

ビタミン及びミネラル

ENSURE PLUS 8-fl-oz服用量で、25の重要ビタミンとミネラルのRDIの少なくとも15%が供給される。

カフェイン

チョコレートフレーバーは8-fl-ozあたり3.1mgのカフェインを含む。コーヒーフレーバーはごく微量のカフェインを含む。

F. ENSURE PLUS® HN

用法：ENSURE PLUS HNは栄養学的に完全な高カロリー、高窒素の液体食品であり、より高いカロリーやタンパク質を必要としているか、あるいは制限量の摂取しかできない人のために設計されたものである。経口栄養補助剤や、チューブによる総合栄養支持剤に用い得る。ENSURE PLUS HNはラクトース、グルテンを含まない。

患者の条件：

・手術、外傷などの後の、高いカロリー、タンパク質を必要としている患者

- ・制限量しか摂取できない患者や初期飽満の患者

特徴

- ・補助または総合栄養剤
- ・経口またはチューブでの摂取用
- ・1.5CaV/mL
- ・高窒素
- ・高カロリー密度

成分

バニラ : ④-D 水、マルトデキストリン (コーン)、カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム、コーン油、糖 (ショ糖)、大豆タンパク質単離物、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、リン酸カルシウム三塩基、大豆レシチン、天然香料、人工香料、クエン酸ナトリウム、塩化コリン、アスコルビン酸、タウリン、L-カルニチン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、ナイアシンアミド、カラゲナン、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸第二銅、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、パルミチン酸ビタミンA、葉酸、ビオチン、塩化クロム、モリブデン酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、亜セレン酸ナトリウム、フィロキノン、シアノコバラミン、及びビタミンD₃

G. ENSURE® POWDER

用法：ENSURE POWDER (水により再構成する) は、低残渣の液体食品で、主として、食事と共に、もしくは食間に使用する経口栄養補助剤として設計されたものである。ENSURE POWDERはラクトース、グルテンを含まず、低コレステロール食餌療法を含む調整食餌療法での使用に適している。

患者の条件：

- ・調整食餌療法中の患者
- ・栄養的危険のある年配の患者
- ・病気または手術から回復途上の患者
- ・低残渣食餌療法を要する患者

特徴

- ・手軽で簡単に混ぜられる

- ・低飽和脂肪
- ・服用量あたり全脂肪量 9 g、5 mg未満のコレステロール
- ・高ビタミン、高ミネラル
- ・低コレステロール食餌療法用
- ・ラクトース非含有、消化しやすい

成分：[®]-D コーンシロップ、マルトデキストリン（コーン）、糖（ショ糖）、コーン油、カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム、大豆タンパク質単離物、人工香料、クエン酸カリウム、塩化マグネシウム、クエン酸ナトリウム、リン酸カルシウム三塩基、塩化カリウム、大豆レシチン、アスコルビン酸、塩化コリン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、塩化チアミン塩酸塩、硫酸第二銅、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、パルミチン酸ビタミンA、葉酸、ビオチン、モリブデン酸ナトリウム、塩化クロム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノ、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

タンパク質

タンパク質源は2種の高生物価タンパク質、カゼイン及び大豆の混合物である。

。

カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム	84%
大豆タンパク質単離物	16%

脂肪

脂肪源はコーンオイルである。

コーンオイル	100%
--------	------

炭水化物

ENSURE POWDERは、コーンシロップ、マルトデキストリンとショ糖の組合せを含む。ENSURE POWDERのマイルドな甘さに加えてピーカン、チェリー、イチゴ、レモン、オレンジの VARI-FLAVORS[®]フレーバーバックは風味への飽きを防ぎ、患者の服用承諾を助ける。

バニラ

コーンシロップ	35%
マルトデキストリン	35%
ショ糖	30%

H. ENSURE® PUDDING

用法：ENSURE PUDDINGは、非液体形態のバランスのとれた栄養を与える高栄養密度補助剤で、食事と共にまたは食間に使用される。コンシステンシー調整食餌療法（例えば、ソフト、ピューレ、あるいは完全な液体）または嚥下障害を持つ患者に適している。ENSURE PUDDINGはグルテンを含まない。

患者の条件：

- ・コンシステンシー調整食餌療法（例えばソフト、ピューレ、あるいは完全な液体）中の患者

- ・嚥下障害を持つ患者

特徴

- ・豊かでクリーミーな味わい、美味
- ・必須なビタミン、ミネラルの良好な供給源、冷蔵不要で便利
- ・グルテン非含有

5oz当たりの栄養組成：カロリー 250、タンパク質 10.9%、全脂肪 34.9%、炭水化物 54.2%

成分：

バニラ：●-D 脱脂乳、水分、糖（ショ糖）、部分的に水素化された大豆油、改質食用スターチ、硫酸マグネシウム、ナトリウムステアロイルラクチレート、リン酸ナトリウム二塩基、人工香料、アスコルビン酸、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸α-トコフェリル、塩化コリン、ナイアシンアミド、硫酸マンガン、パントテン酸カルシウム、FD&C黄色5号、クエン酸カリウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、FD&C黄色6号、葉酸、ビオチン、フィロキノン、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

タンパク質

タンパク質源は脱脂乳である。

脱脂乳 100%

脂肪

脂肪源は水素化された大豆油である。

水素化された大豆油 100%

炭水化物

ENSURE PUDDINGは、ショ糖と改変食用スターチの組合せを含む。マイルドな

甘さとフレーバーの種類（バニラ、チョコレート、バタースコッチ、タピオカ）は風味への飽きを防ぐ。製品は服用量あたり9.2gのラクトースを含む。

バニラ及びその他のチョコレート以外のフレーバー

ショ糖 56%

ラクトース 27%

修飾食用スターチ 17%

チョコレート

ショ糖 58%

ラクトース 26%

修飾食用スターチ 16%

I. ENSURE® WITH FIBER

用法：ENSURE WITH FIBERは、栄養学的に完全な繊維含有液体食品で、高食物繊維及び栄養分が有用な人用に設計されたものである。ENSURE WITH FIBERは低残渣食餌療法が必要でない人に適している。経口でもチューブでも給餌でき、日々の食餌療法のための栄養補助剤として、または適量で食事の代替としても用いることができる。ENSURE WITH FIBERはラクトース、グルテンを含まず、低コレステロール食餌療法を含む調整食餌療法での使用に適している。

患者の条件

- ・高食物繊維及び栄養分から利益を受ける患者

特徴

- ・新規な進歩した組成-低飽和脂肪でより高い食物繊維と栄養分
- ・服用量あたり全脂肪6g、5mg未満のコレステロール

- ・豊かでクリーミーな味わい
- ・食物繊維の良好な供給源

- ・必須ビタミン、ミネラルの優秀な供給源
- ・低コレステロール食餌療法用
- ・ラクトース、グルテン非含有

成分

バニラ : ●-D・水、マルトデキストリン (コーン)、糖 (ショ糖)、カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム、オート麦繊維、高オレイン酸ベニバナ油、キャノーラ油、大豆タンパク質単離物、コーン油、大豆繊維、リン酸カルシウム三塩基、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、セルロースゲル、大豆レシチン、リン酸カリウム二塩基、クエン酸ナトリウム、天然香料、人工香料、塩化コリン、リン酸マグネシウム、アスコルビン酸、セルロースガム、塩化カリウム、カラゲナン、硫酸第一鉄、酢酸 α -トコフェリル、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、硫酸マンガン、パントテン酸カルシウム、硫酸第二銅、パルミチン酸ビタミンA、塩化チアミン塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、葉酸、塩化クロム、ビオチン、モリブデン酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD₃、及びシアノコバラミン

タンパク質

タンパク質源は2種の高生物価タンパク質、カゼイン及び大豆の混合物である。

。

カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸カルシウム 80%

大豆タンパク質単離物 20%

脂肪

脂肪源は3種のオイル、高オレイン酸ベニバナ油、キャノーラ油、コーン油の混合である。

高オレイン酸ベニバナ油 40%

キャノーラ油 40%

コーン油 20%

ENSURE WITH FIBERの脂肪レベルは、アメリカ心臓学会 (AHA) のガイドラインに合致する。ENSURE WITH FIBERの6 gの脂肪は全カロリー中の22%を占め、脂肪中の2.01%は飽和脂肪酸、6.7%は多不飽和脂肪酸からのものである。これらの数値は、脂肪由来は全カロリーの30%以下、飽和脂肪酸由来は10%未満、多不飽和脂肪酸由来は10%以下とするAHAガイドラインの範囲内である。

炭水化物

ENSURE WITH FIBERは、マルトデキストリンとショ糖の組合せを含む。マイルドな甘さとフレーバーの種類(バニラ、チョコレート、バターピーカン)、それに加えてピーカン、チェリー、イチゴ、レモン、オレンジの VARI-FLAVORS® フレーバーパックは、風味への飽きを防ぎ、患者の服用承諾を助ける。

バニラ及びその他のチョコレート以外のフレーバー

マルトデキストリン	66%
ショ糖	25%
オート麦繊維	7%
大豆繊維	2%

チョコレート

マルトデキストリン	55%
ショ糖	36%
オート麦繊維	7%
大豆繊維	2%

繊維

ENSURE WITH FIBERで用いられている繊維混合物は、オート麦繊維と大豆多糖類からなる。この混合物は、8-FL-OZ一缶あたり4 gの総食物繊維量を含む。不溶性対水溶性繊維の比率は、95:5である。

上記及びその他の当業者に知られる種々の栄養補助剤は、本発明のPUFAによ

り代替され、及び／または補助され得る。

J. Oxepa™ 栄養剤

Oxepaは低炭水化物、高カロリー密度腸吸収性栄養剤であり、ARDSの患者ないしその危険性がある患者の食餌管理のために設計されたものである。エイコサペンタエン酸(魚油由来EPA)、γ-リノレン酸(ルリヂサ油由来GLA)、及び高レベルの抗酸化剤からなる特許取得済オイル混合物を含む、ユニークな成分の組合せを有する。

カロリー分布：

- ・カロリー密度は、エネルギー要求に合致する容量を最小にするために、1.5Cal/mL(355Cal/8fl oz)と高くなっている。
- ・Oxepaのカロリー分布を表7に示す。

表7 Oxepaのカロリー分布			
	8 fl oz 当たり	リットル当たり	カロリー%
カロリー	355	1,500	-
脂肪 (g)	22.2	93.7	55.2
炭水化物 (g)	25	105.5	28.1
タンパク質 (g)	14.8	62.5	16.7
水 (g)	186	785	-

脂肪：

- ・Oxepaは、8-fl oz服用量当たり22.2 gの脂肪を含む(93.7g/L)。
- ・脂肪源は、31.8%のキャノーラ油、25%の中鎖トリグリセリド(MCT)、20%のルリヂサ油、20%の魚油、3.2%の大豆レシチンの油混合物である。Oxepaの典型的な脂肪酸組成を表8に示す。
- ・Oxepaは表10に示すように、バランスの取れた量の、多不飽和脂肪酸、単不飽和脂肪酸、及び飽和脂肪酸を与える。
- ・中鎖トリグリセリド(MCT、脂肪混合物の25%)は、胆汁酸による乳化なしに腸管で吸収されるので胃を空にする助けになる。

OxepaTM 栄養剤の種々の脂肪酸組成は、本発明のPUFAにより代替及び／または補助され得る。

表8 典型的な脂肪酸組成

	全脂肪酸%	g/8 fl oz*	g/L*
カブロン酸(6:0)	0.2	0.04	0.18
カプリル酸(8:0)	14.69	3.1	13.07
カプリン酸(10:0)	11.06	2.33	9.87
パルミチン酸(16:0)	5.59	1.18	4.98
パルミトレイン酸(16:1n-7)	1.82	0.38	1.62
ステアリン酸(18:0)	1.84	0.39	1.64
オレイン酸(18:1n-9)	24.44	5.16	21.75
リノール酸(18:2n-6)	16.28	3.44	14.49
α -リノレン酸(18:3n-3)	3.47	0.73	3.09
γ -リノレン酸(18:3n-6)	4.82	1.02	4.29
エイコサペンタエン酸(20:5n-3)	5.11	1.08	4.55
n-3-ドコサペンタエン酸(22:5n-3)	0.55	0.12	0.49
ドコサヘキサエン酸(22:6n-3)	2.27	0.48	2.02
その他	7.55	1.52	6.72

*脂肪酸は全脂肪の約 95%

表9 Oxepa の脂肪組成

脂肪由来の全カロリー%	55.2
多不飽和脂肪酸	31.44 g/L
単不飽和脂肪酸	25.53 g/L
飽和脂肪酸	32.38 g/L
n-6 対 n-3 の比	1.75:1
コレステロール	9.49 mg/8 fl oz 40.1 mg/L

炭水化物

- ・ 8-fl-oz服用量当たり 25.0g の炭水化物を含む(105.5g/L)。
- ・ 炭水化物源は、45%マルトデキストリン（複合炭水化物）と 55%ショ糖（単純糖）で、双方とも消化、吸収しやすい。
- ・ Oxepaの高脂肪、低炭水化物含量は、二酸化炭素（CO₂）生産を最低限にする

ために設計されたものである。高い二酸化炭素レベルは、人口呼吸器依存患者の自立を困難なものにする。低レベルの炭水化物は、ストレス性高血糖症を起こした患者にも有効であり得る。

- ・ Oxepaはラクトースを含まない。

食物炭水化物、タンパク質由来のアミノ酸、脂肪のグリセロール部分は体内で

ブドウ糖に変換される。この過程を通じて、グルコース依存性組織（中枢神経系や赤血球等）の炭水化物要求が満たされる。これに対し、炭水化物なしの食餌はケトーシス、組織タンパク質の過剰な異化、及び液体、電解質の不足をを引き起こす。これらの作用は、カロリー摂取量が適当ならば、毎日50~100gの可消化炭水化物を摂取することで防ぎ得る。Oxepaの炭水化物レベルは、エネルギー要求が満たされている場合には、糖新生を最小にするのにも充分である。

タンパク質：

- ・ Oxepaは、8-fl-oz服用量当たり14.8gのタンパク質を含む(62.5g/L)。
- ・ 全カロリー対窒素の比率(150:1)は、ストレス下にある患者の要求に合致する。
- ・ Oxepaは同化を促進し、呼吸の問題を促進することなく少ない体重を維持するのに十分なタンパク質を供給する。呼吸障害のある患者にとって、高タンパク質摂取は懸念事項である。タンパク質はCO₂生産にほとんど影響しないものの、高タンパク質の食餌は呼吸器系の運動を増加させる。
- ・ Oxepaのタンパク質源はカゼイン酸ナトリウム86.8%、カゼイン酸カルシウム13.2%である。
- ・ 表11に示したように、Oxepaにおけるタンパク質系のアミノ酸プロファイルは、National Academy of Sciencesにより設定された高品質タンパク質の標準に合致するかまたはこれを超えるものである。
- ・ Oxepaは、グルテンを含まない。

本明細書で挙げた全ての刊行物及び特許出願は、本発明が属する技術的分野の

当業者の技術の水準を示している。全ての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物及び特許出願が具体的かつ個々に引用により示されているのと同様に、引用により本明細書の一部とする。

本発明についての記載は以上であるが、添付の請求の範囲の概念あるいは範囲から逸脱することなく多くの変更及び改変を加え得ることは当業者に明らかであろう。

配列表

配列番号:1

配列の長さ: 1617 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA (ゲノム)

配列

CGACACTCCT TCCTTCTTCT CACCCGTCCT AGTCCCCTTC AACCCCCCTC TTTGACAAAG	60
ACAACAAACC ATGGCTGCTG CTCCCAGTGT GAGGACGTTT ACTCGGGCCG AGGTTTTGAA	120
TGCCGAGGCT CTGAATGAGG GCAAGAAGGA TGCCGAGGCA CCCTTCTTGA TGATCATCGA	180
CAACAAGGTG TACGATGTCC GCGAGTTCGT CCGTGATCAT CCCGGTGGAA GTGTGATTCT	240
CACGCACGTT GGCAAGGACG GCACTGACGT CTTTGACACT TTTCACCCCG AGGCTGCTTG	300
GGAGACTCTT GCCAACTTTT ACGTTGGTGA TATTGACGAG AGCGACCGCG ATATCAAGAA	360
TGATGACTTT GCGGCCGAGG TCCGCAAGCT GCGTACCTTG TTCCAGTCTC TTGGTTACTA	420
CGATTCTTCC AAGGCATACT ACGCCTTCAA GGTCTCGTTC AACCTCTGCA TCTGGGGTTT	480
GTCCACGGTC ATTGTGGCCA AGTGGGGCCA GACCTCGACC CTCGCCAACG TGCTCTCGGC	540
TGCGCTTTTG GGTCTGTTCT GGCAGCAGTG CGGATGGTTG GCTCAGGACT TTTTGCATCA	600
CCAGGTCTTC CAGGACCGTT TCTGGGGTGA TCTTTTCGGC GCCTTCTTGG GAGGTGTCTG	660
CCAGGGCTTC TCGTCCTCGT GGTGGAAGGA CAAGCACAAC ACTCACCACG CCGCCCCCAA	720
CGTCCACGGC GAGGATCCCG ACATTGACAC CCACCCTCTG TTGACCTGGA GTGAGCATGC	780
GTTGGAGATG TTCTCGGATG TCCCAGATGA GGAGCTGACC CGCATGTGGT CGCGTTTCAT	840
GGTCCTGAAC CAGACCTGGT TTTACTTCCC CATTCTCTCG TTTGCCCGTC TCTCCTGGTG	900
CCTCCAGTCC ATTCTCTTTG TGCTGCCTAA CGGTCAGGCC CACAAGCCCT CGGGCGCGCG	960
TGTGCCCATC TCGTTGGTCG AGCAGCTGTC GCTTGCGATG CACTGGACCT GGTACCTCGC	1020
CACCATGTTC CTGTTTATCA AGGATCCCGT CAACATGCTG GTGTACTTTT TGGTGTGCGA	1080
GGCGGTGTGC GGAAACTTGT TGGCGATCGT GTTCTCGCTC AACCACAACG GTATGCCTGT	1140

GATCTCGAAG GAGGAGGCGG TCGATATGGA TTTCTTCACG AAGCAGATCA TCACGGGTCG 1200
 TGATGTCCAC CCGGGTCTAT TTGCCAACTG GTTCACGGGT GGATTGAACT ATCAGATCGA 1260
 GCACCACTTG TTCCCTTCGA TGCCTCGCCA CAACTTTTCA AAGATCCAGC CTGCTGTCTGA 1320
 GACCCTGTGC AAAAAGTACA ATGTCCGATA CCACACCACC GGTATGATCG AGGGAACTGC 1380
 AGAGGTCTTT AGCCGTCTGA ACGAGGTCTC CAAGGCTGCC TCCAAGATGG GTAAGGCGCA 1440
 GTAAAAA AAAACAAGGAC GTTTTTTTC GCCAGTGCCT GTGCCTGTGC CTGCTTCCT 1500
 TGTCAAGTCG AGCGTTTCTG GAAAGGATCG TTCAGTGCAG TATCATCATT CTCCTTTTAC 1560
 CCCCCGCTCA TATCTCATT ATTCTCTTA TAAACAAC TGTCCCCC TTCACCG 1617

配列番号:2

配列の長さ: 457 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met Ala Ala Ala Pro Ser Val Arg Thr Phe Thr Arg Ala Glu Val Leu

1 5 10 15

Asn Ala Glu Ala Leu Asn Glu Gly Lys Lys Asp Ala Glu Ala Pro Phe

20 25 30

Leu Met Ile Ile Asp Asn Lys Val Tyr Asp Val Arg Glu Phe Val Pro

35 40 45

Asp His Pro Gly Gly Ser Val Ile Leu Thr His Val Gly Lys Asp Gly

50 55 60

Thr Asp Val Phe Asp Thr Phe His Pro Glu Ala Ala Trp Glu Thr Leu

65 70 75 80

Ala Asn Phe Tyr Val Gly Asp Ile Asp Glu Ser Asp Arg Asp Ile Lys

85 90 95

Asn Asp Asp Phe Ala Ala Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu Phe Gln			
100	105	110	
Ser Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Ala Tyr Tyr Ala Phe Lys Val			
115	120	125	
Ser Phe Asn Leu Cys Ile Trp Gly Leu Ser Thr Val Ile Val Ala Lys			
130	135	140	
Trp Gly Gln Thr Ser Thr Leu Ala Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu			
145	150	155	160
Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His			
165	170	175	
His Gln Val Phe Gln Asp Arg Phe Trp Gly Asp Leu Phe Gly Ala Phe			
180	185	190	
Leu Gly Gly Val Cys Gln Gly Phe Ser Ser Ser Trp Trp Lys Asp Lys			
195	200	205	
His Asn Thr His His Ala Ala Pro Asn Val His Gly Glu Asp Pro Asp			
210	215	220	
Ile Asp Thr His Pro Leu Leu Thr Trp Ser Glu His Ala Leu Glu Met			
225	230	235	240
Phe Ser Asp Val Pro Asp Glu Glu Leu Thr Arg Met Trp Ser Arg Phe			
245	250	255	
Met Val Leu Asn Gln Thr Trp Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Ser Phe Ala			
260	265	270	
Arg Leu Ser Trp Cys Leu Gln Ser Ile Leu Phe Val Leu Pro Asn Gly			
275	280	285	
Gln Ala His Lys Pro Ser Gly Ala Arg Val Pro Ile Ser Leu Val Glu			
290	295	300	
Gln Leu Ser Leu Ala Met His Trp Thr Trp Tyr Leu Ala Thr Met Phe			
305	310	315	320
Leu Phe Ile Lys Asp Pro Val Asn Met Leu Val Tyr Phe Leu Val Ser			

	325	330	335
Gln Ala Val Cys Gly Asn Leu Leu Ala Ile Val Phe Ser Leu Asn His			
340	345	350	
Asn Gly Met Pro Val Ile Ser Lys Glu Glu Ala Val Asp Met Asp Phe			
355	360	365	
Phe Thr Lys Gln Ile Ile Thr Gly Arg Asp Val His Pro Gly Leu Phe			
370	375	380	
Ala Asn Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu			
385	390	395	400
Phe Pro Ser Met Pro Arg His Asn Phe Ser Lys Ile Gln Pro Ala Val			
405	410	415	
Glu Thr Leu Cys Lys Lys Tyr Asn Val Arg Tyr His Thr Thr Gly Met			
420	425	430	
Ile Glu Gly Thr Ala Glu Val Phe Ser Arg Leu Asn Glu Val Ser Lys			
435	440	445	
Ala Ala Ser Lys Met Gly Lys Ala Gln			
450	455		

配列番号:3

配列の長さ: 1488 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA (ゲノム)

配列

GTCCCCTGTC GCTGTCGGCA CACCCCATCC TCCCTCGCTC CCTCTGCGTT TGTCCCTTGGC	60
CCACCGTCTC TCCTCCACCC TCCGAGACGA CTGCAACTGT AATCAGGAAC CGACAAATAC	120
ACGATTTCCT TTTACTCAGC ACCAACTCAA AATCCTCAAC CGCAACCCTT TTTCAGGATG	180

GCACCTCCCA	ACACTATCGA	TGCCGGTTTG	ACCCAGCGTC	ATATCAGCAC	CTCGGCCCCA	240
AACTCGGCCA	AGCCTGCCTT	CGAGCGCAAC	TACCAGCTCC	CCGAGTTCAC	CATCAAGGAG	300
ATCCGAGAGT	GCATCCCTGC	CCACTGCTTT	GAGCGCTCCG	GTCTCCGTGG	TCTCTGCCAC	360
GTTGCCATCG	ATCTGACTTG	GGCGTCGCTC	TTGTTCCCTG	CTGCGACCCA	GATCGACAAG	420
TTTGAGAATC	CCTTGATCCG	CTATTTGGCC	TGGCCTGTTT	ACTGGATCAT	GCAGGGTATT	480
GTCTGCACCG	GTGTCTGGGT	GCTGGCTCAC	GAGTGTGGTC	ATCAGTCCTT	CTCGACCTCC	540
AAGACCTCA	ACAACACAGT	TGGTTGGATC	TTGCACTCGA	TGCTCTTGGT	CCCCTACCAC	600
TCCTGGAGAA	TCTCGCACTC	GAAGCACCAC	AAGGCCACTG	GCCATATGAC	CAAGGACCAG	660
GTCTTTGTGC	CCAAGACCCG	CTCCCAGGTT	GGCTTGCCCTC	CCAAGGAGAA	CGCTGCTGCT	720
GCCGTTACAG	AGGAGGACAT	GTCCGTGCAC	CTGGATGAGG	AGGCTCCCAT	TGTGACTTTG	780
TTCTGGATGG	TGATCCAGTT	CTTGTTCCGA	TGGCCCGCGT	ACCTGATTAT	GAACGCCTCT	840
GGCCAAGACT	ACGGCCGCTG	GACCTCGCAC	TTCCACACGT	ACTCGCCCAT	CTTTGAGCCC	900
CGCAACTTTT	TCGACATTAT	TATCTCGGAC	CTCGGTGTGT	TGGCTGCCCT	CGGTGCCCTG	960
ATCTATGCCT	CCATGCAGTT	GTCGCTCTTG	ACCGTCACCA	AGTACTATAT	TGTCCCCTAC	1020
CTCTTTGTCA	ACTTTTGGTT	GGTCCTGATC	ACCTTCTTGC	AGCACACCGA	TCCAAGCTG	1080
CCCCATTACC	GCGAGGGTGC	CTGGAATTC	CAGCGTGGAG	CTCTTTGCAC	CGTTGACCGC	1140
TCGTTTGGCA	AGTTCTTGGA	CCATATGTTT	CACGGCATTG	TCCACACCCA	TGTGGCCCAT	1200
CACTTGTCT	CGCAAATGCC	GTTCTACCAT	GCTGAGGAAG	CTACCTATCA	TCTCAAGAAA	1260
CTGCTGGGAG	AGTACTATGT	GTACGACCCA	TCCCCGATCG	TCGTTGCGGT	CTGGAGGTCG	1320
TTCCGTGAGT	GCCGATTCGT	GGAGGATCAG	GGAGACGTGG	TCTTTTCAA	GAAGTAAAAA	1380
AAAAGACAAT	GGACCACACA	CAACCTTGTC	TCTACAGACC	TACGTATCAT	GTAGCCATAC	1440
CACTTCATAA	AAGAACATGA	GCTCTAGAGG	CGTGTCATTG	GCGCCTCC		1488

配列番号:4

配列の長さ: 399 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met Ala Pro Pro Asn Thr Ile Asp Ala Gly Leu Thr Gln Arg His Ile
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ala Pro Asn Ser Ala Lys Pro Ala Phe Glu Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Gln Leu Pro Glu Phe Thr Ile Lys Glu Ile Arg Glu Cys Ile Pro Ala
 35 40 45
 His Cys Phe Glu Arg Ser Gly Leu Arg Gly Leu Cys His Val Ala Ile
 50 55 60
 Asp Leu Thr Trp Ala Ser Leu Leu Phe Leu Ala Ala Thr Gln Ile Asp
 65 70 75 80
 Lys Phe Glu Asn Pro Leu Ile Arg Tyr Leu Ala Trp Pro Val Tyr Trp
 85 90 95
 Ile Met Gln Gly Ile Val Cys Thr Gly Val Trp Val Leu Ala His Glu
 100 105 110
 Cys Gly His Gln Ser Phe Ser Thr Ser Lys Thr Leu Asn Asn Thr Val
 115 120 125
 Gly Trp Ile Leu His Ser Met Leu Leu Val Pro Tyr His Ser Trp Arg
 130 135 140
 Ile Ser His Ser Lys His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Lys Asp
 145 150 155 160
 Gln Val Phe Val Pro Lys Thr Arg Ser Gln Val Gly Leu Pro Pro Lys
 165 170 175
 Glu Asn Ala Ala Ala Ala Val Gln Glu Glu Asp Met Ser Val His Leu
 180 185 190
 Asp Glu Glu Ala Pro Ile Val Thr Leu Phe Trp Met Val Ile Gln Phe
 195 200 205
 Leu Phe Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Ile Met Asn Ala Ser Gly Gln Asp

210	215	220	
Tyr Gly Arg Trp Thr Ser His Phe His Thr Tyr Ser Pro Ile Phe Glu			
225	230	235	240
Pro Arg Asn Phe Phe Asp Ile Ile Ile Ser Asp Leu Gly Val Leu Ala			
	245	250	255
Ala Leu Gly Ala Leu Ile Tyr Ala Ser Met Gln Leu Ser Leu Leu Thr			
	260	265	270
Val Thr Lys Tyr Tyr Ile Val Pro Tyr Leu Phe Val Asn Phe Trp Leu			
	275	280	285
Val Leu Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp Pro Lys Leu Pro His Tyr			
	290	295	300
Arg Glu Gly Ala Trp Asn Phe Gln Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp			
305	310	315	320
Arg Ser Phe Gly Lys Phe Leu Asp His Met Phe His Gly Ile Val His			
	325	330	335
Thr His Val Ala His His Leu Phe Ser Gln Met Pro Phe Tyr His Ala			
	340	345	350
Glu Glu Ala Thr Tyr His Leu Lys Lys Leu Leu Gly Glu Tyr Tyr Val			
	355	360	365
Tyr Asp Pro Ser Pro Ile Val Val Ala Val Trp Arg Ser Phe Arg Glu			
	370	375	380
Cys Arg Phe Val Glu Asp Gln Gly Asp Val Val Phe Phe Lys Lys			
385	390	395	

配列番号:5

配列の長さ: 1483 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA (ゲノム)

配列

```

GCTTCCTCCA GTTCATCCTC CATTTCGCCA CCTGCATTCT TTACGACCGT TAAGCAAGAT   60
GGGAACGGAC CAAGGAAAAA CCTTCACCTG GGAAGAGCTG GCGGCCATA ACACCAAGGA   120
CGACCTACTC TTGGCCATCC GCGGCAGGGT GTACGATGTC ACAAAGTTCT TGAGCCGCCA   180
TCCTGGTGGG GTGGACACTC TCCTGCTCGG AGCTGGCCGA GATGTTACTC CGGTCTTTGA   240
GATGTATCAC GCGTTTGGGG CTGCAGATGC CATTATGAAG AAGTACTATG TCGGTACACT   300
GGTCTCGAAT GAGCTGCCCA TCTTCCCGGA GCCAACGGTG TTCCACAAAA CCATCAAGAC   360
GAGAGTCGAG GGCTACTTTA CGGATCGGAA CATTGATCCC AAGAATAGAC CAGAGATCTG   420
GGGACGATAC GCTCTTATCT TTGGATCCTT GATCGCTTCC TACTACGCGC AGCTCTTTGT   480
GCCTTTCGTT GTCGAACGCA CATGGCTTCA GGTGGTGTTT GCAATCATCA TGGGATTTCG   540
GTGCGCACAA GTCGGACTCA ACCCTCTTCA TGATGCGTCT CACTTTTCAG TGACCCACAA   600
CCCCACTGTC TGGAAGATTC TGGGAGCCAC GCACGACTTT TTCAACGGAG CATCGTACCT   660
GGTGTGGATG TACCAACATA TGCTCGGCCA TCACCCCTAC ACCAACATTG CTGGAGCAGA   720
TCCCAGCGTG TCGACGTCTG AGCCCGATGT TCGTCGTATC AAGCCCAACC AAAAGTGTT   780
TGTCACCAC ATCAACCAGC ACATGTTTGT TCCTTTCCTG TACGGACTGC TGGCGTTCAA   840
GGTGCGCATT CAGGACATCA ACATTTTGTA CTTTGTCAAG ACCAATGACG CTATTGCGTG   900
CAATCCCATC TCGACATGGC AACTGTGTAT GTTCTGGGGC GGCAAGGCTT TCTTTGTCTG   960
GTATCGCCTG ATTGTTCCCC TGCAGTATCT GCCCCTGGGC AAGGTGCTGC TCTTGTTTAC 1020
GGTCGCGGAC ATGGTGTCGT CTTACTGGCT GCGCTGACC TTCCAGGCGA ACCACGTTGT 1080
TGAGGAAGTT CAGTGGCCGT TGCCTGACGA GAACGGGATC ATCCAAAAGG ACTGGGCAGC 1140
TATGCAGGTC GAGACTACGC AGGATTACGC ACACGATTGC CACCTCTGGA CCAGCATCAC 1200
TGGCAGCTTG AACTACCAGG CTGTGCACCA TCTGTTCCCC AACGTGTCGC AGCACCATTA 1260
TCCCGATATT CTGGCCATCA TCAAGAACAC CTGCAGCGAG TACAAGGTTT CATACCTTGT 1320
CAAGGATACG TTTTGGCAAG CATTGCTTTC ACATTTGGAG CACTTGCGTG TTCTTGGACT 1380
CCGTCCCAAG GAAGAGTAGA AGAAAAAAG CGCCGAATGA AGTATTGCCC CCTTTTCTC 1440
CAAGAATGGC AAAAGGAGAT CAAGTGGACA TTCTCTATGA AGA 1483

```


配列番号:6

配列の長さ: 446 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr
 20 25 30
 Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu
 35 40 45
 Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His
 50 55 60
 Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His
 85 90 95
 Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asn Ile
 100 105 110
 Asp Pro Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe
 115 120 125
 Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val
 130 135 140
 Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe
 145 150 155 160
 Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe

165	170	175
Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His		
180	185	190
Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met		
195	200	205
Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val		
210	215	220
Ser Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp		
225	230	235
Phe Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly		
245	250	255
Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe		
260	265	270
Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His		
275	280	285
Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu		
290	295	300
Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe		
305	310	315
Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln		
325	330	335
Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn		
340	345	350
Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln		
355	360	365
Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu		
370	375	380
Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His		
385	390	395
		400

Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys
 405 410 415
 Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His
 420 425 430
 Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu
 435 440 445

配列番号:7

配列の長さ: 355 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu Phe Gln Ser Leu Gly Tyr Tyr Asp
 1 5 10 15
 Ser Ser Lys Ala Tyr Tyr Ala Phe Lys Val Ser Phe Asn Leu Cys Ile
 20 25 30
 Trp Gly Leu Ser Thr Val Ile Val Ala Lys Trp Gly Gln Thr Ser Thr
 35 40 45
 Leu Ala Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu Gly Leu Phe Trp Gln Gln
 50 55 60
 Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His His Gln Val Phe Gln Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Trp Gly Asp Leu Phe Gly Ala Phe Leu Gly Gly Val Cys Gln
 85 90 95
 Gly Phe Ser Ser Ser Trp Trp Lys Asp Lys His Asn Thr His His Ala
 100 105 110

Ala Pro Asn Val His Gly Glu Asp Pro Asp Ile Asp Thr His Pro Leu
 115 120 125
 Leu Thr Trp Ser Glu His Ala Leu Glu Met Phe Ser Asp Val Pro Asp
 130 135 140
 Glu Glu Leu Thr Arg Met Trp Ser Arg Phe Met Val Leu Asn Gln Thr
 145 150 155 160
 Trp Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Ser Phe Ala Arg Leu Ser Trp Cys Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ile Leu Phe Val Leu Pro Asn Gly Gln Ala His Lys Pro Ser
 180 185 190
 Gly Ala Arg Val Pro Ile Ser Leu Val Glu Gln Leu Ser Leu Ala Met
 195 200 205
 His Trp Thr Trp Tyr Leu Ala Thr Met Phe Leu Phe Ile Lys Asp Pro
 210 215 220
 Val Asn Met Leu Val Tyr Phe Leu Val Ser Gln Ala Val Cys Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Ile Val Phe Ser Leu Asn His Asn Gly Met Pro Val Ile
 245 250 255
 Ser Lys Glu Glu Ala Val Asp Met Asp Phe Phe Thr Lys Gln Ile Ile
 260 265 270
 Thr Gly Arg Asp Val His Pro Gly Leu Phe Ala Asn Trp Phe Thr Gly
 275 280 285
 Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Met Pro Arg
 290 295 300
 His Asn Phe Ser Lys Ile Gln Pro Ala Val Glu Thr Leu Cys Lys Lys
 305 310 315 320
 Tyr Asn Val Arg Tyr His Thr Thr Gly Met Ile Glu Gly Thr Ala Glu
 325 330 335
 Val Phe Ser Arg Leu Asn Glu Val Ser Lys Ala Ala Ser Lys Met Gly

340

345

350

Lys Ala Gln

355

配列番号:8

配列の長さ: 104 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Val Thr Leu Tyr Thr Leu Ala Phe Val Ala Ala Asn Ser Leu Gly Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gly Val Leu Ala Cys Pro Ser Val Xaa Pro His Gln Ile Ala

20

25

30

Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Ile Gly Xaa

35

40

45

Asp Ser Gly His Tyr Val Ile Met Ser Asn Lys Ser Asn Asn Xaa Phe

50

55

60

Ala Gln Leu Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ile Ala Trp Trp

65

70

75

80

Lys Trp Thr His Asn Ala His His Leu Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr

85

90

95

Gly Pro Asn Leu Gln His Ile Pro

100

配列番号:9

配列の長さ: 252 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Gly Val Leu Tyr Gly Val Leu Ala Cys Thr Ser Val Phe Ala His Gln
 1 5 10 15
 Ile Ala Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Ile
 20 25 30
 Gly His Asp Ser Gly His Tyr Val Ile Met Ser Asn Lys Ser Tyr Asn
 35 40 45
 Arg Phe Ala Gln Leu Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ala Trp Trp Lys Trp Thr His Asn Ala His His Leu Ala Cys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His Ile Pro Val Phe Ala Val Ser
 85 90 95
 Thr Lys Phe Phe Ser Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Arg Lys Leu
 100 105 110
 Thr Phe Gly Pro Val Ala Arg Phe Leu Val Ser Tyr Gln His Phe Thr
 115 120 125
 Tyr Tyr Pro Val Asn Cys Phe Gly Arg Ile Asn Leu Phe Ile Gln Thr
 130 135 140
 Phe Leu Leu Leu Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn
 145 150 155 160
 Phe Ala Gly Ile Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser
 165 170 175
 Cys Leu Pro Asn Trp Pro Glu Arg Phe Phe Phe Val Phe Thr Ser Phe

	180		185		190
Thr Val Thr Ala Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala					
195		200		205	
Ala Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Thr Gly Ser Asp Trp Phe Glu Lys					
210		215		220	
Gln Ala Ala Gly Thr Ile Asp Ile Ser Cys Arg Ser Tyr Met Asp Trp					
225		230		235	240
Phe Phe Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His					
	245		250		

配列番号:10

配列の長さ: 125 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Gly Xaa Xaa Asn Phe Ala Gly Ile Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro				
1	5	10	15	
Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro Asn Trp Pro Glu Arg Phe Xaa Phe Val				
	20	25	30	
Phe Thr Gly Phe Thr Val Thr Ala Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu				
	35	40	45	
Asn His Phe Ala Ala Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Thr Gly Ser Asp				
	50	55	60	
Trp Phe Glu Lys Gln Ala Ala Gly Thr Ile Asp Ile Ser Cys Arg Ser				
65	70	75	80	
Tyr Met Asp Trp Phe Phe Cys Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His				

	85		90		95										
Leu	Phe	Pro	Arg	Leu	Pro	Arg	Cys	His	Leu	Arg	Lys	Val	Ser	Pro	Val
	100		105		110										
Gly	Gln	Arg	Gly	Phe	Gln	Arg	Lys	Xaa	Asn	Leu	Ser	Xaa			
	115		120		125										

配列番号:11

配列の長さ: 131 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Pro	Ala	Thr	Glu	Val	Gly	Gly	Leu	Ala	Trp	Met	Ile	Thr	Phe	Tyr	Val
1			5				10					15			
Arg	Phe	Phe	Leu	Thr	Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Lys	Ala	Phe	Leu
			20				25					30			
Gly	Leu	Phe	Phe	Ile	Val	Arg	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Trp	Phe	Val	Trp
			35				40					45			
Val	Thr	Gln	Met	Asn	His	Ile	Pro	Met	His	Ile	Asp	His	Asp	Arg	Asn
			50				55					60			
Met	Asp	Trp	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Gln	Ala	Thr	Cys	Asn	Val	His	Lys
			65				70				75			80	
Ser	Ala	Phe	Asn	Asp	Trp	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Asn	Phe	Gln	Ile	Glu
			85				90				95				
His	His	Leu	Phe	Pro	Thr	Met	Pro	Arg	His	Asn	Tyr	His	Xaa	Val	Ala
			100				105				110				
Pro	Leu	Val	Gln	Ser	Leu	Cys	Ala	Lys	His	Gly	Ile	Glu	Tyr	Gln	Ser

115 120 125
 Lys Pro Leu
 130

配列番号:12

配列の長さ: 87 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Cys Ser Pro Lys Ser Ser Pro Thr Arg Asn Met Thr Pro Ser Pro Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu
 20 25 30
 Phe Pro Thr Met Pro Arg Cys Asn Leu Asn Arg Cys Met Lys Tyr Val
 35 40 45
 Lys Glu Trp Cys Ala Glu Asn Asn Leu Pro Tyr Leu Val Asp Asp Tyr
 50 55 60
 Phe Val Gly Tyr Asn Leu Asn Leu Gln Gln Leu Lys Asn Met Ala Glu
 65 70 75 80
 Leu Val Gln Ala Lys Ala Ala
 85

配列番号:13

配列の長さ: 143 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Arg	His	Glu	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Met	Leu	Val
1				5					10					15	
Cys	Met	Gln	Trp	Thr	Asp	Leu	Leu	Trp	Ala	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	Arg
				20					25					30	
Phe	Phe	Leu	Ser	Tyr	Ser	Pro	Phe	Tyr	Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu
				35					40					45	
Leu	Phe	Val	Ala	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Ser	His	Trp	Phe	Val	Trp	Ile
				50					55					60	
Thr	Gln	Met	Asn	His	Ile	Pro	Lys	Glu	Ile	Gly	His	Glu	Lys	His	Arg
				65					70					75	
Asp	Trp	Ala	Ser	Ser	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Cys	Asn	Val	Glu	Pro	Ser
				85					90					95	
Leu	Phe	Ile	Asp	Trp	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Asn	Phe	Gln	Ile	Glu	His
				100					105					110	
His	Leu	Phe	Pro	Thr	Met	Thr	Arg	His	Asn	Tyr	Arg	Xaa	Val	Ala	Pro
				115					120					125	
Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Cys	Ala	Lys	His	Gly	Leu	His	Tyr	Glu	Val	
				130					135					140	

配列番号:14

配列の長さ: 186 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Leu His His Thr Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val Ser
 1 5 10 15
 Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp Phe
 20 25 30
 Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly Leu
 35 40 45
 Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe Val
 50 55 60
 Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His Thr
 65 70 75 80
 Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu Ile
 85 90 95
 Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe Thr
 100 105 110
 Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln Ala
 115 120 125
 Asn Tyr Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn Gly
 130 135 140
 Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu Asn
 165 170 175
 Tyr Gln Xaa Val His His Leu Phe Pro His
 180 185

配列番号:15

配列の長さ: 5 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

His Xaa Xaa His His

1

5

配列番号:16

配列の長さ: 446 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn

1

5

10

15

His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr

20

25

30

Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu

35

40

45

Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His

50

55

60

Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr

65

70

75

80

Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Val Tyr Arg Lys Leu

85

90

95

Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile			
100	105	110	
Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val			
115	120	125	
Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly			
130	135	140	
Cys Leu Met Gly Phe Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp			
145	150	155	160
Ala Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met			
165	170	175	
Gly Ile Phe Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp			
180	185	190	
Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr			
195	200	205	
Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Phe			
210	215	220	
Phe Gly Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Arg Leu Thr Phe Asp			
225	230	235	240
Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro			
245	250	255	
Ile Met Cys Ala Ala Arg Leu Asn Met Tyr Val Gln Ser Leu Ile Met			
260	265	270	
Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu Leu Leu Gly			
275	280	285	
Cys Leu Val Phe Ser Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro			
290	295	300	
Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Ile Ala Ser Leu Ser Val Thr			
305	310	315	320
Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val			

325 330 335
 Tyr Val Gly Lys Pro Lys Gly Asn Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Asp
 340 345 350
 Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Pro Trp Met Asp Trp Phe His Gly
 355 360 365
 Gly Leu Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Lys Met Pro Arg
 370 375 380
 Cys Asn Leu Arg Lys Ile Ser Pro Tyr Val Ile Glu Leu Cys Lys Lys
 385 390 395 400
 His Asn Leu Pro Tyr Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met
 405 410 415
 Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr
 420 425 430
 Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr
 435 440 445

配列番号:17

配列の長さ: 359 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Phe Thr Gln Lys Arg Gly Phe Arg
 1 5 10 15
 Arg Val Leu Asn Gln Arg Val Asp Ala Tyr Phe Ala Glu His Gly Leu
 20 25 30
 Thr Gln Arg Asp Asn Pro Ser Met Tyr Leu Lys Thr Leu Ile Ile Val

35	40	45
Leu Trp Leu Phe Ser Ala Trp Ala Phe Val Leu Phe Ala Pro Val Ile		
50	55	60
Phe Pro Val Arg Leu Leu Gly Cys Met Val Leu Ala Ile Ala Leu Ala		
65	70	75
Ala Phe Ser Phe Asn Val Gly His Asp Ala Asn His Asn Ala Tyr Ser		
85	90	95
Ser Asn Pro His Ile Asn Arg Val Leu Gly Met Thr Tyr Asp Phe Val		
100	105	110
Gly Leu Ser Ser Phe Leu Trp Arg Tyr Arg His Asn Tyr Leu His His		
115	120	125
Thr Tyr Thr Asn Ile Leu Gly His Asp Val Glu Ile His Gly Asp Gly		
130	135	140
Ala Val Arg Met Ser Pro Glu Gln Glu His Val Gly Ile Tyr Arg Phe		
145	150	155
Gln Gln Phe Tyr Ile Trp Gly Leu Tyr Leu Phe Ile Pro Phe Tyr Trp		
165	170	175
Phe Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Val Leu Asn Lys Gly Lys Tyr His Asp		
180	185	190
His Lys Ile Pro Pro Phe Gln Pro Leu Glu Leu Ala Ser Leu Leu Gly		
195	200	205
Ile Lys Leu Leu Trp Leu Gly Tyr Val Phe Gly Leu Pro Leu Ala Leu		
210	215	220
Gly Phe Ser Ile Pro Glu Val Leu Ile Gly Ala Ser Val Thr Tyr Met		
225	230	235
Thr Tyr Gly Ile Val Val Cys Thr Ile Phe Met Leu Ala His Val Leu		
245	250	255
Glu Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Asp Gly Glu Ser Gly Ala Ile Asp		
260	265	270

Asp Glu Trp Ala Ile Cys Gln Ile Arg Thr Thr Ala Asn Phe Ala Thr
 275 280 285
 Asn Asn Pro Phe Trp Asn Trp Phe Cys Gly Gly Leu Asn His Gln Val
 290 295 300
 Thr His His Leu Phe Pro Asn Ile Cys His Ile His Tyr Pro Gln Leu
 305 310 315 320
 Glu Asn Ile Ile Lys Asp Val Cys Gln Glu Phe Gly Val Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Val Tyr Pro Thr Phe Lys Ala Ala Ile Ala Ser Asn Tyr Arg Trp Leu
 340 345 350
 Glu Ala Met Gly Lys Ala Ser
 355

配列番号:18

配列の長さ: 365 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met Thr Ser Thr Thr Ser Lys Val Thr Phe Gly Lys Ser Ile Gly Phe
 1 5 10 15
 Arg Lys Glu Leu Asn Arg Arg Val Asn Ala Tyr Leu Glu Ala Glu Asn
 20 25 30
 Ile Ser Pro Arg Asp Asn Pro Pro Met Tyr Leu Lys Thr Ala Ile Ile
 35 40 45
 Leu Ala Trp Val Val Ser Ala Trp Thr Phe Val Val Phe Gly Pro Asp
 50 55 60

Val Leu Trp Met Lys Leu Leu Gly Cys Ile Val Leu Gly Phe Gly Val			
65	70	75	80
Ser Ala Val Gly Phe Asn Ile Ser His Asp Gly Asn His Gly Gly Tyr			
	85	90	95
Ser Lys Tyr Gln Trp Val Asn Tyr Leu Ser Gly Leu Thr His Asp Ala			
	100	105	110
Ile Gly Val Ser Ser Tyr Leu Trp Lys Phe Arg His Asn Val Leu His			
	115	120	125
His Thr Tyr Thr Asn Ile Leu Gly His Asp Val Glu Ile His Gly Asp			
	130	135	140
Glu Leu Val Arg Met Ser Pro Ser Met Glu Tyr Arg Trp Tyr His Arg			
	145	150	155
Tyr Gln His Trp Phe Ile Trp Phe Val Tyr Pro Phe Ile Pro Tyr Tyr			
	165	170	175
Trp Ser Ile Ala Asp Val Gln Thr Met Leu Phe Lys Arg Gln Tyr His			
	180	185	190
Asp His Glu Ile Pro Ser Pro Thr Trp Val Asp Ile Ala Thr Leu Leu			
	195	200	205
Ala Phe Lys Ala Phe Gly Val Ala Val Phe Leu Ile Ile Pro Ile Ala			
	210	215	220
Val Gly Tyr Ser Pro Leu Glu Ala Val Ile Gly Ala Ser Ile Val Tyr			
	225	230	235
Met Thr His Gly Leu Val Ala Cys Val Val Phe Met Leu Ala His Val			
	245	250	255
Ile Glu Pro Ala Glu Phe Leu Asp Pro Asp Asn Leu His Ile Asp Asp			
	260	265	270
Glu Trp Ala Ile Ala Gln Val Lys Thr Thr Val Asp Phe Ala Pro Asn			
	275	280	285
Asn Thr Ile Ile Asn Trp Tyr Val Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Thr Val			

290 295 300
His His Leu Phe Pro His Ile Cys His Ile His Tyr Pro Lys Ile Ala
305 310 315 320
Pro Ile Leu Ala Glu Val Cys Glu Glu Phe Gly Val Asn Tyr Ala Val
325 330 335
His Gln Thr Phe Phe Gly Ala Leu Ala Ala Asn Tyr Ser Trp Leu Lys
340 345 350
Lys Met Ser Ile Asn Pro Glu Thr Lys Ala Ile Glu Gln
355 360 365

配列番号:19

配列の長さ: 35 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCAAGCTTCT GCAGGAGCTC TTTTTTTTTT TTTT

35

配列番号:20

配列の長さ: 32 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成オリゴヌクレオチド)

配列の特徴

特徴を表す記号: misc_feature

存在位置: 21

他の情報: N=イノシンまたはシトシン

配列の特徴

特徴を表す記号: misc_feature

存在位置: 27

他の情報: N=イノシンまたはシトシン

配列

CUACUACUAC UACAYCAYAC NTAYACNAAY AT

32

配列番号:21

配列の長さ: 27 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成オリゴヌクレオチド)

配列の特徴

特徴を表す記号: misc_feature

存在位置: 13

他の情報: N=イノシンまたはシトシン

配列の特徴

特徴を表す記号: misc_feature

存在位置: 19

他の情報: N=イノシンまたはシトシン

配列

CAUCAUCAUC AUNGGRAANA RRTGRTG

27

配列番号:22

配列の長さ: 33 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CUACUACUAC UAGGAGTCCT CTACGGTGTT TTG

33

配列番号:23

配列の長さ: 33 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CAUCAUCAUC AUATGATGCT CAAGCTGAAA CTG

33

配列番号:24

配列の長さ: 5 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

Gln Xaa Xaa His His

1

5

配列番号:25

配列の長さ: 39 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CUACUACUAC UACTCGAGCA AGATGGGAAC GGACCAAGG

39

配列番号:26

配列の長さ: 39 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CAUCAUCAUC AUCTCGAGCT ACTCTTCCTT GGGACGGAG

39

配列番号:27

配列の長さ: 47 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CUACUACUAC UATCTAGACT CGAGACCATG GCTGCTGCTC CAGTGTG

47

配列番号:28

配列の長さ: 40 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CAUCAUAC AUAGGCCTCG AGTTACTGCG CCTTACCCAT

40

配列番号:29

配列の長さ: 37 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

CUACUACUA CUAGGATCCA TGGCACCTCC CAACACT

37

配列番号:30

配列の長さ: 42 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

CAUCAUCAU CAUGGTACCT CGAGTTACTT CTTGAAAAAG AC

42

配列番号:31

配列の長さ: 1219 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (編集されたコンティグ 2692004)

配列

```
GCACGCCGAC CGGCGCCGGG AGATCCTGGC AAAGTATCCA GAGATAAAGT CCTTGATGAA    60
ACCTGATCCC AATTTGATAT GGATTATAAT TATGATGGTT CTCACCCAGT TGGGTGCATT   120
TTACATAGTA AAAGACTTGG ACTGGAAATG GGTCAATTTT GGGGCCTATG CGTTTGGCAG   180
TTGCATTAAAC CACTCAATGA CTCTGGCTAT TCATGAGATT GCCCACAATG CTGCCTTTGG   240
CAACTGCAAA GCAATGTGGA ATCGCTGGTT TGGAAATGTTT GCTAATCTTC CTATTGGGAT   300
TCCATATTCA ATTTCCCTTA AGAGGTATCA CATGGATCAT CATCGGTACC TTGGAGCTGA   360
TGGCGTCGAT GTAGATATTC CTACCGATTT TGAGGGCTGG TTCTTCTGTA CCGCTTTCAG   420
AAAGTTTATA TGGGTTATTC TTCAGCCTCT CTTTATGCCC TTTCGACCTC TGTTTCATCAA   480
CCCCAAACCA ATTACGTATC TGGAAGTTAT CAATACCGTG GCACAGGTCA CTTTTGACAT   540
TTTAATTTAT TACTTTTTTG GAATTAAATC CTTAGTCTAC ATGTTGGCAG CATCTTTACT   600
TGGCCTGGGT TTGCACCCAA TTTCTGGACA TTTTATAGCT GAGCATTACA TGTTCTTAAA   660
GGGTCA TGAA ACTTACTCAT ATTATGGGCC TCTGAATTIA CTTACCTTCA ATGTGGGTTA   720
TCATAATGAA CATCATGATT TCCCCAACAT TCCTGGAAAA AGTCTTCCAC TGGTGAGGAA   780
AATAGCAGCT GAATACTATG ACAACCTCCC TCACTACAAT TCCTGGATAA AAGTACTGTA   840
TGATTTTGTG ATGGATGATA CAATAAGTCC CTA CTCAAGA ATGAAGAGGC ACCAAAAAGG   900
AGAGATGGTG CTGGAGTAAA TATCATTAGT GCCAAAGGGA TTCTTCTCCA AAAC TTTAGA   960
TGATAAAATG GAATTTTTCG ATTATTAAAC TTGAGACCAG TGATGCTCAG AAGCTCCCCT  1020
GGCACAATTT CAGAGTAAGA GCTCGGTGAT ACCAAGAAGT GAATCTGGCT TTAAACAGT  1080
CAGCCTGACT CTGTACTGCT CAGTTTCACT CACAGGAAAC TTGTGACTTG TGTATTATCG  1140
TCATTGAGGA TGTTTCACTC ATGTCTGTCA TTTTATAAGC ATATCATTTA AAAAGCTTCT  1200
AAAAAGCTAT TCGCCAGG                                     1219
```

配列番号:32

配列の長さ: 655 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (編集されたコンティグ 2153526)

配列

```
TTACCTTCTA CGTCCGCTTC TTCCTCACTT ATGTGCCACT ATTGGGGCTG AAAGCTTCCT    60
GGGCCTTTTC TTCATAGTCA GGTTCCTGGA AAGCAACTGG TTTGTGTGGG TGACACAGAT    120
GAACCATATT CCCATGCACA TTGATCATGA CCGGAACATG GACTGGGTTT CCACCCAGCT    180
CCAGGCCACA TGCAATGTCC ACAAGTCTGC CTTCAATGAC TGGTTCAGTG GACACCTCAA    240
CTTCCAGATT GAGCACCATC TTTTCCCAC GATGCCTCGA CACAATTACC ACAAAGTGGC    300
TCCCCTGGTG CAGTCCTTGT GTGCCAAGCA TGGCATAGAG TACCAGTCCA AGCCCCTGCT    360
GTCAGCCTTC GCCGACATCA TCCACTCACT AAAGGAGTCA GGGCAGCTCT GGCTAGATGC    420
CTATCTTCAC CAATAACAAC AGCCACCCTG CCCAGTCTGG AAGAAGAGGA GGAAGACTCT    480
GGAGCCAAGG CAGAGGGGAG CTTGAGGGAC AATGCCACTA TAGTTTAATA CTCAGAGGGG    540
GTTGGGTTTG GGGACATAAA GCCTCTGACT CAAACTCCTC CCTTTTATCT TCTAGCCACA    600
GTTCTAAGAC CCAAAGTGGG GGGTGGACAC AGAAGTCCCT AGGAGGGAAG GAGCT        655
```

配列番号:33

配列の長さ: 304 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (編集されたコンティグ 3506132)

配列

```
GTCTTTTACT TTGGCAATGG CTGGATTCCT ACCCTCATCA CGGCCTTTGT CCTTGCTACC    60
```


TCTCAGGCCC AAGCTGGATG GCTGCAACAT GATTATGGCC ACCTGTCTGT CTACAGAAAA	120
CCCAAGTGGG ACCACCTTGT CCACAAATTC GTCATTGGCC ACTTAAAGGG TGCCTCTGCC	180
AACTGGTGGG ATCATCGCCA CTTCCAGCAC CACGCCAAGC CTAACATCTT CCACAAGGAT	240
CCCGATGTGA ACATGCTGCA CGTGTTTGTT CTGGGCGAAT GGCAGCCCAT CGAGTACGGC	300
AAGA	304

配列番号:34

配列の長さ: 918 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (編集されたコンティグ 3854933)

配列

CAGGGACCTA CCCCGCGCTA CTTACCTGG GACGAGGTGG CCCAGCGCTC AGGGTGCGAG	60
GAGCGGTGGC TAGTGATCGA CCGTAAGGTG TACAACATCA GCGAGTTCAC CCGCCGGCAT	120
CCAGGGGGCT CCCGGGTGCT CAGCCACTAC GCCGGGCAGG ATGCCACGGA TCCCTTTGTG	180
GCCTTCCACA TCAACAAGGG CTTTGTGAAG AAGTATATGA ACTCTCTCCT GATTGGAGAA	240
CTGTCTCCAG AGCAGCCCAG CTTTGAGCCC ACCAAGAATA AAGAGCTGAC AGATGAGTTC	300
CGGGAGCTGC GGGCCACAGT GGAGCGGATG GGGCTCATGA AGGCCAACCA TGTCTTCTTC	360
CTGCTGTACC TGCTGCACAT CTTGCTGCTG GATGGTGACG CCTGGCTCAC CTTTGGGTG	420
TTTGGGACGT CCTTTTGGC CTTCTCCTC TGTGCGGTGC TGCTCAGTGC AGTTCAGGCC	480
CAGGCTGGCT GGCTGCAGCA TGACTTTGGG CACCTGTCGG TCTTCAGCAC CTCAAAGTGG	540
AACCATCTGC TACATCATTT TGTGATTGGC CACCTGAAGG GGGCCCCCGC CAGTTGGTGG	600
AACCACATGC ACTTCCAGCA CCATGCCAAG CCCAACTGCT TCCGCAAAGA CCCAGACATC	660
AACATGCATC CCTTCTTCTT TGCCTTGGGG AAGATCCTCT CTGTGGAGCT TGGGAAACAG	720
AAGAAAAAAT ATATGCCGTA CAACCACCAG CACARATACT TCTTCCTAAT TGGGCCCCCA	780
GCCTTGCTGC CTCTCTACTT CCAGTGGTAT ATTTTCTATT TTGTTATCCA GCGAAAGAAG	840
TGGGTGGACT TGGCCTGGAT CAGCAAACAG GAATACGATG AAGCCGGGCT TCCATTGTCC	900

ACCGCAAATG CTTCTAAA

918

配列番号:35

配列の長さ: 1686 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (編集されたコンティグ 2511785)

配列

GCCACTTAAA GGGTGCCTCT GCCAACTGGT GGAATCATCG CCACTTCCAG CACCACGCCA	60
AGCCTAACAT CTTCCACAAG GATCCCGATG TGAACATGCT GCACGTGTTT GTTCTGGGCG	120
AATGGCAGCC CATCGAGTAC GGCAAGAAGA AGCTGAAATA CCTGCCCTAC AATCACCAGC	180
ACGAATACTT CTTCTGATT GGGCCGCCG TGCTCATCCC CATGTATTTC CAGTACCAGA	240
TCATCATGAC CATGATCGTC CATAAGAACT GGGTGGACCT GGCCTGGGCC GTCAGCTACT	300
ACATCCGGTT CTTTCATACC TACATCCCTT TCTACGGCAT CCTGGGAGCC CTCCTTTTCC	360
TCAACTTCAT CAGGTTCCCTG GAGAGCCACT GGTTTGTGTG GGTACACAG ATGAATCACA	420
TCGTATGGA GATTGACCAG GAGGCCTACC GTGACTGGTT CAGTAGCCAG CTGACAGCCA	480
CCTGCAACGT GGAGCAGTCC TTCTTCAACG ACTGGTTCAG TGGACACCTT AACTTCCAGA	540
TTGAGCACCA CCTCTTCCCC ACCATGCCCC GGCACAACCT ACACAAGATC GCCCCGCTGG	600
TGAAGTCTCT ATGTGCCAAG CATGGCATTG AATACCAGGA GAAGCCGCTA CTGAGGGCCC	660
TGCTGGACAT CATCAGGTCC CTGAAGAAGT CTGGGAAGCT GTGGCTGGAC GCCTACCTTC	720
ACAAATGAAG CCACAGCCCC CGGGACACCG TGGGGAAGGG GTGCAGGTGG GGTGATGGCC	780
AGAGGAATGA TGGGCTTTTG TTCTGAGGGG TGTCGAGAG GCTGGTGTAT GCACTGCTCA	840
CGGACCCCAT GTTGATCTT TCTCCCTTTC TCCTCTCCTT TTTCTCTTCA CATCTCCCCC	900
ATAGCACCCT GCCCTCATGG GACCTGCCCT CCCTCAGCCG TCAGCCATCA GCCATGGCCC	960
TCCCAGTGCC TCCTAGCCCC TTCTTCCAAG GAGCAGAGAG GTGGCCACCG GGGGTGGCTC	1020
TGTCTACCT CCACTCTCTG CCCCTAAAGA TGGGAGGAGA CCAGCGGTCC ATGGGTCTGG	1080
CCTGTGAGTC TCCCCTTGCA GCCTGGTCAC TAGGCATCAC CCCCCTTTG GTTCTTCAGA	1140

TGCTCTTGGG GTTCATAGGG GCAGGTCCTA GTCGGGCAGG GCCCCTGACC CTCCCGGCCT 1200
 GGCTTCACTC TCCCTGACGG CTGCCATTGG TCCACCCTTT CATAGAGAGG CCTGCTTTGT 1260
 TACAAAGCTC GGGTCTCCCT CCTGCAGCTC GGTAAAGTAC CCGAGGCCTC TCTTAAGATG 1320
 TCCAGGGCCC CAGGCCCCGG GGCACAGCCA GCCCAAACCT TGGGCCCTGG AAGAGTCCTC 1380
 CACCCCATCA CTAGAGTGCT CTGACCCTGG GCTTTCACGG GCCCCATTCC ACCGCCTCCC 1440
 CAACTTGAGC CTGTGACCTT GGGACCAAAG GGGGAGTCCC TCGTCTCTTG TGA CTAGCA 1500
 GAGGCAGTGG CCACGTTGAG GGAGGGGCG GCTGGCCTGG AGGCTCAGCC CACCCTCCAG 1560
 CTTTCTCTCA GGGTGTCTG AGGTCCAAGA TTCTGGAGCA ATCTGACCCT TCTCCAAAGG 1620
 CTCTGTTATC AGCTGGGCAG TGCCAGCCAA TCCCTGGCCA TTTGGCCCCA GGGGACGTGG 1680
 GCCCTG 1686

配列番号:36

配列の長さ: 1843 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (コンティグ 2535)

配列

GTCTTTTACT TTGGCAATGG CTGGATTCCCT ACCCTCATCA CGGCCTTTGT CCTTGCTACC 60
 TCTCAGGCCC AAGCTGGATG GCTGCAACAT GATTATGGCC ACCTGTCTGT CTACAGAAAA 120
 CCCAAGTGA ACCACCTTGT CCACAAATTC GTCATTGGCC ACTTAAAGGG TGCCTCTGCC 180
 AACTGGTGGA ATCATCGCCA CTTCCAGCAC CACGCCAAGC CTAACATCTT CCACAAGGAT 240
 CCCGATGTGA ACATGCTGCA CGTGTGTTGTT CTGGGCGAAT GGCAGCCCAT CGAGTACGGC 300
 AAGAAGAAGC TGAAATACCT GCCCTACAAT CACCAGCAGG AATACTTCTT CCTGATTGGG 360
 CCGCCGCTGC TCATCCCCAT GTATTTCCAG TACCAGATCA TCATGACCAT GATCGTCCAT 420
 AAGAACTGGG TGGACCTGGC CTGGGCCGTC AGCTACTACA TCCGGTTCTT CATCACCTAC 480
 ATCCCTTTCT ACGGCATCCT GGGAGCCCTC CTTTCTCTCA ACTTCATCAG GTTCCTGGAG 540
 AGCCACTGGT TTGTGTGGGT CACACAGATG AATCACATCG TCATGGAGAT TGACCAGGAG 600

```

GCCTACCGTG ACTGGTTCAG TAGCCAGCTG ACAGCCACCT GCAACGTGGA GCAGTCCTTC 660
TTCAACGACT GGTTCAGTGG ACACCTTAAC TTCCAGATTG AGCACCACCT CTTCCCCACC 720
ATGCCCCGGC ACAACTTACA CAAGATCGCC CCGCTGGTGA AGTCTCTATG TGCCAAGCAT 780
GGCATTGAAT ACCAGGAGAA GCCGCTACTG AGGGCCCTGC TGGACATCAT CAGGTCCCTG 840
AAGAAGTCTG GGAAGCTGTG GCTGGACGCC TACCTTCACA AATGAAGCCA CAGCCCCCGG 900
GACACCGTGG GGAAGGGGTG CAGGTGGGGT GATGGCCAGA GGAATGATGG GCTTTTGTTT 960
TGAGGGGTGT CCGAGAGGCT GGTGTATGCA CTGCTCACGG ACCCATGTT GGATCTTTCT 1020
CCCTTTCTCC TCTCCTTTT CTCTTCACAT CTCCCCATA GCACCCTGCC CTCATGGGAC 1080
CTGCCCTCCC TCAGCCGTCA GCCATCAGCC ATGGCCCTCC CAGTGCCTCC TAGCCCCCTC 1140
TTCCAAGGAG CAGAGAGGTG GCCACCGGGG GTGGCTCTGT CCTACCTCCA CTCTCTGCCC 1200
CTAAAGATGG GAGGAGACCA GCGGTCCATG GGTCTGGCCT GTGAGTCTCC CTTGCAGCC 1260
TGGTCACTAG GCATCACCCC CGCTTTGGTT CTTCAGATGC TCTTGGGGTT CATAGGGGCA 1320
GGTCCTAGTC GGGCAGGGCC CCTGACCCTC CCGGCCTGGC TTCACTCTCC CTGACGGCTG 1380
CCATTGGTCC ACCCTTTCAT AGAGAGGCCT GCTTTGTAC AAAGCTCGGG TCTCCCTCCT 1440
GCAGCTCGGT TAAGTACCCG AGGCCTCTCT TAAGATGTCC AGGGCCCCAG GCCCGGGGGC 1500
ACAGCCAGCC CAAACCTTGG GCCCTGGAAG AGTCCTCCAC CCCATCACTA GAGTGCTCTG 1560
ACCCTGGGCT TTCACGGGCC CCATTCCACC GCCTCCCCAA CTTGAGCCTG TGACCTTGGG 1620
ACCAAAGGGG GAGTCCCTCG TCTCTTGTA CTCAGCAGAG GCAGTGGCCA CGTTCAGGGA 1680
GGGGCCGGCT GGCCTGGAGG CTCAGCCCAC CCTCCAGCTT TTCCTCAGG TGTCCTGAGG 1740
TCCAAGATTC TGGAGCAATC TGACCCTTCT CCAAAGGCTC TGTTATCAGC TGGGCAGTGC 1800
CAGCCAATCC CTGGCCATTT GGCCCCAGGG GACGTGGGCC CTG 1843

```

配列番号:37

配列の長さ: 2257 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (編集されたコンティグ 253538a)

配列

CAGGGACCTA CCCC GCGCTA CTTACCTGG GACGAGGTGG CCCAGCGCTC AGGGTGCGAG	60
GAGCGGTGGC TAGTGATCGA CCGTAAGGTG TACAACATCA GCGAGTTCAC CCGCCGGCAT	120
CCAGGGGGCT CCGGGGTCAT CAGCCACTAC GCCGGGCAGG ATGCCACGGA TCCCTTTGTG	180
GCCTTCCACA TCAACAAGGG CCTTGGAAG AAGTATATGA ACTCTCTCCT GATTGGAGAA	240
CTGTCTCCAG AGCAGCCCAG CTTTGAGCCC ACCAAGAATA AAGAGCTGAC AGATGAGTTC	300
CGGGAGCTGC GGGCCACAGT GGAGCGGATG GGGCTCATGA AGGCCAACCA TGTCTTCTTC	360
CTGCTGTACC TGCTGCACAT CTGCTGCTG GATGGTGCAG CCTGGCTCAC CCTTTGGGTC	420
TTTGGGACGT CCTTTTGGC CTTCTCTC TGTGCGGTGC TGCTCAGTGC AGTTCAGCAG	480
GCCCAAGCTG GATGGCTGCA ACATGATTAT GGCCACCTGT CTGTCTACAG AAAACCCAAG	540
TGGAACCACC TTGTCCACAA ATTCGTCATT GGCCACTTAA AGGGTGCTC TGCCAAGTGG	600
TGGAATCATC GCCACTTCCA GCACCACGCC AAGCCTAACA TCTTCCACAA GGATCCCGAT	660
GTGAACATGC TGCACGTGTT TGTCTGGGC GAATGGCAGC CCATCGAGTA CGGCAAGAAG	720
AAGCTGAAAT ACCTGCCCTA CAATCACCAG CACGAATACT TCTTCTGAT TGGGCCGCCG	780
CTGCTCATCC CCATGTATTT CCAGTACCAG ATCATCATGA CCATGATCGT CCATAAGAAC	840
TGGGTGGACC TGGCCTGGGC CGTCAGCTAC TACATCCGGT TCTTCATCAC CTACATCCCT	900
TTCTACGGCA TCCTGGGAGC CCTCCTTTTC CTCAACTTCA TCAGGTTCTT GGAGAGCCAC	960
TGGTTTGTGT GGGTCACACA GATGAATCAC ATCGTCATGG AGATTGACCA GGAGGCCTAC	1020
CGTGACTGGT TCAGTAGCCA GCTGACAGCC ACCTGCAACG TGGAGCAGTC CTTCTTCAAC	1080
GACTGGTTCA GTGGACACCT TAACTTCCAG ATTGAGCACC ACCTCTTCCC CACCATGCCC	1140
CGGCACAAC TACACAAGAT CGCCCCGCTG GTGAAGTCTC TATGTGCCAA GCATGGCATT	1200
GAATACCAGG AGAAGCCGCT ACTGAGGGCC CTGCTGGACA TCATCAGGTC CCTGAAGAAG	1260
TCTGGGAAGC TGTGGCTGGA CGCCTACCTT CACAAATGAA GCCACAGCCC CCGGGACACC	1320
GTGGGGAAGG GGTGCAGGTG GGGTGATGGC CAGAGGAATG ATGGGCTTTT GTTCTGAGGG	1380
GTGTCCGAGA GGCTGGTGTA TGCACTGCTC ACGGACCCCA TGTTGGATCT TTCTCCCTTT	1440
CTCCTCTCCT TTTTCTCTTC ACATCTCCCC CATAGCACCC TGCCCTCATG GGACCTGCCC	1500
TCCCTCAGCC GTCAGCCATC AGCCAATGGCC CTCCCAGTGC CTCCTAGCCC CTTCTTCCAA	1560
GGAGCAGAGA GGTGGCCACC GGGGGTGGCT CTGTCTACC TCCACTCTCT GCCCCTAAAG	1620
ATGGGAGGAG ACCAGCGGTC CATGGGTCTG GCCTGTGAGT CTCCCCTTGC AGCCTGGTCA	1680

CTAGGCATCA CCCCCGCTTT GGTTCCTCAG ATGCTCTTGG GGTTCATAGG GGCAGGTCCT 1740
 AGTCGGGCAG GGCCCCCTGAC CCTCCCGGCC TGGCTTCACT CTCCCTGACG GCTGCCATTG 1800
 GTCCACCCCTT TCATAGAGAG GCCTGCTTTG TTACAAAGCT CGGGTCTCCC TCCTGCAGCT 1860
 CGGTAAAGTA CCCGAGGCCT CTCTTAAGAT GTCCAGGGCC CCAGGCCCGC GGGCACAGCC 1920
 AGCCCCAAACC TTGGGCCCTG GAAGAGTCCT CCACCCCATC ACTAGAGTGC TCTGACCCTG 1980
 GGCTTTCACG GGCCCCATTC CACCGCCTCC CCAACTTGAG CCTGTGACCT TGGGACCAAA 2040
 GGGGGAGTCC CTCGTCTCTT GTGACTCAGC AGAGGCAGTG GCCACGTTCA GGGAGGGGCC 2100
 GGCTGGCCTG GAGGCTCAGC CCACCCTCCA GCTTTTCCTC AGGGTGTCTT GAGGTCCAAG 2160
 ATTCTGGAGC AATCTGACCC TTCTCCAAAG GCTCTGTTAT CAGCTGGGCA GTGCCAGCCA 2220
 ATCCCTGGCC ATTTGGCCCC AGGGGACGTG GGCCCTG 2257

配列番号:38

配列の長さ: 411 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 2692004 の翻訳)

配列

His	Ala	Asp	Arg	Arg	Arg	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Tyr	Pro	Glu	Ile
1				5						10				15
Lys	Ser	Leu	Met	Lys	Pro	Asp	Pro	Asn	Leu	Ile	Trp	Ile	Ile	Ile
				20						25				30
Met	Met	Val	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ile	Val	Lys	Asp
				35						40				45
Leu	Asp	Trp	Lys	Trp	Val	Ile	Phe	Gly	Ala	Tyr	Ala	Phe	Gly	Ser
				50						55				60
Cys	Ile	Asn	His	Ser	Met	Thr	Leu	Ala	Ile	His	Glu	Ile	Ala	His
				65						70				75

Asn Ala Ala Phe Gly Asn Cys Lys Ala Met Trp Asn Arg Trp Phe		
80	85	90
Gly Met Phe Ala Asn Leu Pro Ile Gly Ile Pro Tyr Ser Ile Ser		
95	100	105
Phe Lys Arg Tyr His Met Asp His His Arg Tyr Leu Gly Ala Asp		
110	115	120
Gly Val Asp Val Asp Ile Pro Thr Asp Phe Glu Gly Trp Phe Phe		
125	130	135
Cys Thr Ala Phe Arg Lys Phe Ile Trp Val Ile Leu Gln Pro Leu		
140	145	150
Phe Tyr Ala Phe Arg Pro Leu Phe Ile Asn Pro Lys Pro Ile Thr		
155	160	165
Tyr Leu Glu Val Ile Asn Thr Val Ala Gln Val Thr Phe Asp Ile		
170	175	180
Leu Ile Tyr Tyr Phe Leu Gly Ile Lys Ser Leu Val Tyr Met Leu		
185	190	195
Ala Ala Ser Leu Leu Gly Leu Gly Leu His Pro Ile Ser Gly His		
200	205	210
Phe Ile Ala Glu His Tyr Met Phe Leu Lys Gly His Glu Thr Tyr		
215	220	225
Ser Tyr Tyr Gly Pro Leu Asn Leu Leu Thr Phe Asn Val Gly Tyr		
230	235	240
His Asn Glu His His Asp Phe Pro Asn Ile Pro Gly Lys Ser Leu		
245	250	255
Pro Leu Val Arg Lys Ile Ala Ala Glu Tyr Tyr Asp Asn Leu Pro		
260	265	270
His Tyr Asn Ser Trp Ile Lys Val Leu Tyr Asp Phe Val Met Asp		
275	280	285
Asp Thr Ile Ser Pro Tyr Ser Arg Met Lys Arg His Gln Lys Gly		

290	295	300
Glu Met Val Leu Glu Xaa Ile Ser Leu Val Pro Lys Gly Phe Phe		
305	310	315
Ser Lys Thr Leu Asp Asp Lys Met Glu Phe Leu His Tyr Xaa Thr		
320	325	330
Xaa Asp Gln Xaa Cys Ser Glu Ala Pro Leu Ala Gln Phe Gln Ser		
335	340	345
Lys Ser Ser Val Ile Pro Arg Ser Glu Ser Gly Phe Xaa Thr Val		
350	355	360
Ser Leu Thr Leu Tyr Cys Ser Val Ser Leu Thr Gly Asn Leu Xaa		
365	370	375
Leu Val Tyr Tyr Arg His Xaa Gly Cys Phe Thr His Val Cys His		
380	385	390
Phe Ile Ser Ile Ser Phe Lys Lys Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ala		
400	405	410
Arg		

配列番号:39

配列の長さ: 218 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 2153526 の翻訳)

配列

Tyr	Leu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Pro	His	Leu	Cys	Ala	Thr	Ile	Gly
1			5				10					15		
Ala	Glu	Ser	Phe	Leu	Gly	Leu	Phe	Phe	Ile	Val	Arg	Phe	Leu	Glu
			20				25					30		

Ser Asn Trp Phe Val Trp Val Thr Gln Met Asn His Ile Pro Met			
35	40	45	
His Ile Asp His Asp Arg Asn Met Asp Trp Val Ser Thr Gln Leu			
50	55	60	
Gln Ala Thr Cys Asn Val His Lys Ser Ala Phe Asn Asp Trp Phe			
65	70	75	
Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr			
80	85	90	
Met Pro Arg His Asn Tyr His Lys Val Ala Pro Leu Val Gln Ser			
95	100	105	
Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Ser Lys Pro Leu Leu			
110	115	120	
Ser Ala Phe Ala Asp Ile Ile His Ser Leu Lys Glu Ser Gly Gln			
125	130	135	
Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Gln Xaa Gln Gln Pro Pro Cys			
140	145	150	
Pro Val Trp Lys Lys Arg Arg Lys Thr Leu Glu Pro Arg Gln Arg			
155	160	165	
Gly Ala Xaa Gly Thr Met Pro Leu Xaa Phe Asn Thr Gln Arg Gly			
170	175	180	
Leu Gly Leu Gly Thr Xaa Ser Leu Xaa Leu Lys Leu Leu Pro Phe			
185	190	195	
Ile Phe Xaa Pro Gln Phe Xaa Asp Pro Lys Trp Gly Val Asp Thr			
200	205	210	
Glu Val Pro Arg Arg Glu Gly Ala			
215			

配列番号:40

配列の長さ: 71 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 3506132 の翻訳)

配列

Val	Phe	Tyr	Phe	Gly	Asn	Gly	Trp	Ile	Pro	Thr	Leu	Ile	Thr	Ala
1				5				10						15
Phe	Val	Leu	Ala	Thr	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Trp	Leu	Gln	His
				20				25						30
Asp	Tyr	Gly	His	Leu	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Pro	Lys	Trp	Asn	His
				35				40						45
Leu	Val	His	Lys	Phe	Val	Ile	Gly	His	Leu	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala
				50				55						60
Asn	Trp	Trp	Asn	His	Arg	His	Phe	Gln	His	His	Ala	Lys	Pro	Asn
				65				70						75
Leu	Gly	Glu	Trp	Gln	Pro	Ile	Glu	Tyr	Gly	Lys	Xaa			
				80				85						

配列番号: 41

配列の長さ: 306 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 3854933 の翻訳)

配列

Gln	Gly	Pro	Thr	Pro	Arg	Tyr	Phe	Thr	Trp	Asp	Glu	Val	Ala	Gln
1				5				10						15

Arg Ser Gly Cys Glu Glu Arg Trp Leu Val Ile Asp Arg Lys Val		
20	25	30
Tyr Asn Ile Ser Glu Phe Thr Arg Arg His Pro Gly Gly Ser Arg		
35	40	45
Val Ile Ser His Tyr Ala Gly Gln Asp Ala Thr Asp Pro Phe Val		
50	55	60
Ala Phe His Ile Asn Lys Gly Leu Val Lys Lys Tyr Met Asn Ser		
65	70	75
Leu Leu Ile Gly Glu Leu Ser Pro Glu Gln Pro Ser Phe Glu Pro		
80	85	90
Thr Lys Asn Lys Glu Leu Thr Asp Glu Phe Arg Glu Leu Arg Ala		
95	100	105
Thr Val Glu Arg Met Gly Leu Met Lys Ala Asn His Val Phe Phe		
110	115	120
Leu Leu Tyr Leu Leu His Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ala Ala Trp		
125	130	135
Leu Thr Leu Trp Val Phe Gly Thr Ser Phe Leu Pro Phe Leu Leu		
140	145	150
Cys Ala Val Leu Leu Ser Ala Val Gln Ala Gln Ala Gly Trp Leu		
155	160	165
Gln His Asp Phe Gly His Leu Ser Val Phe Ser Thr Ser Lys Trp		
170	175	180
Asn His Leu Leu His His Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala		
185	190	195
Pro Ala Ser Trp Trp Asn His Met His Phe Gln His His Ala Lys		
200	205	210
Pro Asn Cys Phe Arg Lys Asp Pro Asp Ile Asn Met His Pro Phe		
215	220	225
Phe Phe Ala Leu Gly Lys Ile Leu Ser Val Glu Leu Gly Lys Gln		

配列番号: 42
配列の長さ: 566 アミノ酸
配列の型: アミノ酸
鎖の数: 一本鎖
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 2511785 の翻訳)
配列

His	Leu	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Asn	Trp	Trp	Asn	His	Arg	His	Phe
1				5					10					15
Gln	His	His	Ala	Lys	Pro	Asn	Ile	Phe	His	Lys	Asp	Pro	Asp	Val
				20					25					30
Asn	Met	Leu	His	Val	Phe	Val	Leu	Gly	Glu	Trp	Gln	Pro	Ile	Glu
				35					40					45
Tyr	Gly	Lys	Lys	Lys	Leu	Lys	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Asn	His	Gln	His
				50					55					60
Glu	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ile	Gly	Pro	Pro	Leu	Leu	Ile	Pro	Met	Tyr

65	70	75
Phe Gln Tyr Gln Ile Ile Met Thr Met Ile Val His Lys Asn Trp		
80	85	90
Val Asp Leu Ala Trp Ala Val Ser Tyr Tyr Ile Arg Phe Phe Ile		
95	100	105
Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Gly Ile Leu Gly Ala Leu Leu Phe Leu		
110	115	120
Asn Phe Ile Arg Phe Leu Glu Ser His Trp Phe Val Trp Val Thr		
125	130	135
Gln Met Asn His Ile Val Met Glu Ile Asp Gln Glu Ala Tyr Arg		
140	145	150
Asp Trp Phe Ser Ser Gln Leu Thr Ala Thr Cys Asn Val Glu Gln		
155	160	165
Ser Phe Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile		
170	175	180
Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu His Lys		
185	190	195
Ile Ala Pro Leu Val Lys Ser Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu		
200	205	210
Tyr Gln Glu Lys Pro Leu Leu Arg Ala Leu Leu Asp Ile Ile Arg		
215	220	225
Ser Leu Lys Lys Ser Gly Lys Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His		
230	235	240
Lys Xaa Ser His Ser Pro Arg Asp Thr Val Gly Lys Gly Cys Arg		
245	250	255
Trp Gly Asp Gly Gln Arg Asn Asp Gly Leu Leu Phe Xaa Gly Val		
260	265	270
Ser Glu Arg Leu Val Tyr Ala Leu Leu Thr Asp Pro Met Leu Asp		
275	280	285

Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ser Phe Phe Ser Ser His Leu Pro His		
290	295	300
Ser Thr Leu Pro Ser Trp Asp Leu Pro Ser Leu Ser Arg Gln Pro		
305	310	315
Ser Ala Met Ala Leu Pro Val Pro Pro Ser Pro Phe Phe Gln Gly		
320	325	330
Ala Glu Arg Trp Pro Pro Gly Val Ala Leu Ser Tyr Leu His Ser		
335	340	345
Leu Pro Leu Lys Met Gly Gly Asp Gln Arg Ser Met Gly Leu Ala		
350	355	360
Cys Glu Ser Pro Leu Ala Ala Trp Ser Leu Gly Ile Thr Pro Ala		
365	370	375
Leu Val Leu Gln Met Leu Leu Gly Phe Ile Gly Ala Gly Pro Ser		
380	385	390
Arg Ala Gly Pro Leu Thr Leu Pro Ala Trp Leu His Ser Pro Xaa		
400	405	410
Arg Leu Pro Leu Val His Pro Phe Ile Glu Arg Pro Ala Leu Leu		
415	420	425
Gln Ser Ser Gly Leu Pro Pro Ala Ala Arg Leu Ser Thr Arg Gly		
430	435	440
Leu Ser Xaa Asp Val Gln Gly Pro Arg Pro Ala Gly Thr Ala Ser		
445	450	455
Pro Asn Leu Gly Pro Trp Lys Ser Pro Pro Pro His His Xaa Ser		
460	465	470
Ala Leu Thr Leu Gly Phe His Gly Pro His Ser Thr Ala Ser Pro		
475	480	485
Thr Xaa Ala Cys Asp Leu Gly Thr Lys Gly Gly Val Pro Arg Leu		
490	495	500
Leu Xaa Leu Ser Arg Gly Ser Gly His Val Gln Gly Gly Ala Gly		

505	510	515
Trp Pro Gly Gly Ser Ala His Pro Pro Ala Phe Pro Gln Gly Val		
520	525	530
Leu Arg Ser Lys Ile Leu Glu Gln Ser Asp Pro Ser Pro Lys Ala		
535	540	545
Leu Leu Ser Ala Gly Gln Cys Gln Pro Ile Pro Gly His Leu Ala		
550	555	560
Pro Gly Asp Val Gly Pro Xaa		
565		

配列番号:43

配列の長さ: 619 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 2535 の翻訳)

配列

Val Phe Tyr Phe Gly Asn Gly Trp Ile Pro Thr Leu Ile Thr Ala		
1	5	10
Phe Val Leu Ala Thr Ser Gln Ala Gln Ala Gly Trp Leu Gln His		
20	25	30
Asp Tyr Gly His Leu Ser Val Tyr Arg Lys Pro Lys Trp Asn His		
35	40	45
Leu Val His Lys Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala Ser Ala		
50	55	60
Asn Trp Trp Asn His Arg His Phe Gln His His Ala Lys Pro Asn		
65	70	75
Ile Phe His Lys Asp Pro Asp Val Asn Met Leu His Val Phe Val		

80	85	90
Leu Gly Glu Trp Gln Pro Ile Glu Tyr Gly Lys Lys Lys Leu Lys		
95	100	105
Tyr Leu Pro Tyr Asn His Gln His Glu Tyr Phe Phe Leu Ile Gly		
110	115	120
Pro Pro Leu Leu Ile Pro Met Tyr Phe Gln Tyr Gln Ile Ile Met		
125	130	135
Thr Met Ile Val His Lys Asn Trp Val Asp Leu Ala Trp Ala Val		
140	145	150
Ser Tyr Tyr Ile Arg Phe Phe Ile Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Gly		
155	160	165
Ile Leu Gly Ala Leu Leu Phe Leu Asn Phe Ile Arg Phe Leu Glu		
170	175	180
Ser His Trp Phe Val Trp Val Thr Gln Met Asn His Ile Val Met		
185	190	195
Glu Ile Asp Gln Glu Ala Tyr Arg Asp Trp Phe Ser Ser Gln Leu		
200	205	210
Thr Ala Thr Cys Asn Val Glu Gln Ser Phe Phe Asn Asp Trp Phe		
215	220	225
Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr		
230	235	240
Met Pro Arg His Asn Leu His Lys Ile Ala Pro Leu Val Lys Ser		
245	250	255
Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Glu Lys Pro Leu Leu		
260	265	270
Arg Ala Leu Leu Asp Ile Ile Arg Ser Leu Lys Lys Ser Gly Lys		
275	280	285
Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Lys Xaa Ser His Ser Pro Arg		
290	295	300

Asp Thr Val Gly Lys Gly Cys Arg Trp Gly Asp Gly Gln Arg Asn			
305	310	315	
Asp Gly Leu Leu Phe Xaa Gly Val Ser Glu Arg Leu Val Tyr Ala			
320	325	330	
Leu Leu Thr Asp Pro Met Leu Asp Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ser			
335	340	345	
Phe Phe Ser Ser His Leu Pro His Ser Thr Leu Pro Ser Trp Asp			
350	355	360	
Leu Pro Ser Leu Ser Arg Gln Pro Ser Ala Met Ala Leu Pro Val			
365	370	375	
Pro Pro Ser Pro Phe Phe Gln Gly Ala Glu Arg Trp Pro Pro Gly			
380	385	390	
Val Ala Leu Ser Tyr Leu His Ser Leu Pro Leu Lys Met Gly Gly			
400	405	410	
Asp Gln Arg Ser Met Gly Leu Ala Cys Glu Ser Pro Leu Ala Ala			
415	420	425	
Trp Ser Leu Gly Ile Thr Pro Ala Leu Val Leu Gln Met Leu Leu			
430	435	440	
Gly Phe Ile Gly Ala Gly Pro Ser Arg Ala Gly Pro Leu Thr Leu			
445	450	455	
Pro Ala Trp Leu His Ser Pro Xaa Arg Leu Pro Leu Val His Pro			
460	465	470	
Phe Ile Glu Arg Pro Ala Leu Leu Gln Ser Ser Gly Leu Pro Pro			
475	480	485	
Ala Ala Arg Leu Ser Thr Arg Gly Leu Ser Xaa Asp Val Gln Gly			
490	495	500	
Pro Arg Pro Ala Gly Thr Ala Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Lys			
505	510	515	
Ser Pro Pro Pro His His Xaa Ser Ala Leu Thr Leu Gly Phe His			

520	525	530
Gly Pro His Ser Thr Ala Ser Pro Thr Xaa Ala Cys Asp Leu Gly		
535	540	545
Thr Lys Gly Gly Val Pro Arg Leu Leu Xaa Leu Ser Arg Gly Ser		
550	555	560
Gly His Val Gln Gly Gly Ala Gly Trp Pro Gly Gly Ser Ala His		
565	570	575
Pro Pro Ala Phe Pro Gln Gly Val Leu Arg Ser Lys Ile Leu Glu		
580	585	590
Gln Ser Asp Pro Ser Pro Lys Ala Leu Leu Ser Ala Gly Gln Cys		
595	600	605
Gln Pro Ile Pro Gly His Leu Ala Pro Gly Asp Val Gly Pro Xaa		
610	615	620

配列番号:44

配列の長さ: 757 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: アミノ酸 (コンティグ 253538a の翻訳)

配列

Gln Gly Pro Thr Pro Arg Tyr Phe Thr Trp Asp Glu Val Ala Gln			
1	5	10	15
Arg Ser Gly Cys Glu Glu Arg Trp Leu Val Ile Asp Arg Lys Val			
20	25	30	
Tyr Asn Ile Ser Glu Phe Thr Arg Arg His Pro Gly Gly Ser Arg			
35	40	45	
Val Ile Ser His Tyr Ala Gly Gln Asp Ala Thr Asp Pro Phe Val			

50	55	60
Ala Phe His Ile Asn Lys Gly Leu Val Lys Lys Tyr Met Asn Ser		
65	70	75
Leu Leu Ile Gly Glu Leu Ser Pro Glu Gln Pro Ser Phe Glu Pro		
80	85	90
Thr Lys Asn Lys Glu Leu Thr Asp Glu Phe Arg Glu Leu Arg Ala		
95	100	105
Thr Val Glu Arg Met Gly Leu Met Lys Ala Asn His Val Phe Phe		
110	115	120
Leu Leu Tyr Leu Leu His Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ala Ala Trp		
125	130	135
Leu Thr Leu Trp Val Phe Gly Thr Ser Phe Leu Pro Phe Leu Leu		
140	145	150
Cys Ala Val Leu Leu Ser Ala Val Gln Gln Ala Gln Ala Gly Trp		
155	160	165
Leu Gln His Asp Tyr Gly His Leu Ser Val Tyr Arg Lys Pro Lys		
170	175	180
Trp Asn His Leu Val His Lys Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly		
185	190	195
Ala Ser Ala Asn Trp Trp Asn His Arg His Phe Gln His His Ala		
200	205	210
Lys Pro Asn Ile Phe His Lys Asp Pro Asp Val Asn Met Leu His		
215	220	225
Val Phe Val Leu Gly Glu Trp Gln Pro Ile Glu Tyr Gly Lys Lys		
230	235	240
Lys Leu Lys Tyr Leu Pro Tyr Asn His Gln His Glu Tyr Phe Phe		
245	250	255
Leu Ile Gly Pro Pro Leu Leu Ile Pro Met Tyr Phe Gln Tyr Gln		
260	265	270

Ile Ile Met Thr Met Ile Val His Lys Asn Trp Val Asp Leu Ala	275	280	285
Trp Ala Val Ser Tyr Tyr Ile Arg Phe Phe Ile Thr Tyr Ile Pro	290	295	300
Phe Tyr Gly Ile Leu Gly Ala Leu Leu Phe Leu Asn Phe Ile Arg	305	310	315
Phe Leu Glu Ser His Trp Phe Val Trp Val Thr Gln Met Asn His	320	325	330
Ile Val Met Glu Ile Asp Gln Glu Ala Tyr Arg Asp Trp Phe Ser	335	340	345
Ser Gln Leu Thr Ala Thr Cys Asn Val Glu Gln Ser Phe Phe Asn	350	355	360
Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu	365	370	375
Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu His Lys Ile Ala Pro Leu	380	385	390
Val Lys Ser Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Glu Lys	400	405	410
Pro Leu Leu Arg Ala Leu Leu Asp Ile Ile Arg Ser Leu Lys Lys	415	420	425
Ser Gly Lys Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Lys Xaa Ser His	430	435	440
Ser Pro Arg Asp Thr Val Gly Lys Gly Cys Arg Trp Gly Asp Gly	445	450	455
Gln Arg Asn Asp Gly Leu Leu Phe Xaa Gly Val Ser Glu Arg Leu	460	465	470
Val Tyr Ala Leu Leu Thr Asp Pro Met Leu Asp Leu Ser Pro Phe	475	480	485
Leu Leu Ser Phe Phe Ser Ser His Leu Pro His Ser Thr Leu Pro			

490	495	500
Ser Trp Asp Leu Pro Ser Leu Ser Arg Gln Pro Ser Ala Met Ala		
505	510	515
Leu Pro Val Pro Pro Ser Pro Phe Phe Gln Gly Ala Glu Arg Trp		
520	525	530
Pro Pro Gly Val Ala Leu Ser Tyr Leu His Ser Leu Pro Leu Lys		
535	540	545
Met Gly Gly Asp Gln Arg Ser Met Gly Leu Ala Cys Glu Ser Pro		
550	555	560
Leu Ala Ala Trp Ser Leu Gly Ile Thr Pro Ala Leu Val Leu Gln		
565	570	575
Met Leu Leu Gly Phe Ile Gly Ala Gly Pro Ser Arg Ala Gly Pro		
580	585	590
Leu Thr Leu Pro Ala Trp Leu His Ser Pro Xaa Arg Leu Pro Leu		
595	600	605
Val His Pro Phe Ile Glu Arg Pro Ala Leu Leu Gln Ser Ser Gly		
610	615	620
Leu Pro Pro Ala Ala Arg Leu Ser Thr Arg Gly Leu Ser Xaa Asp		
625	630	635
Val Gln Gly Pro Arg Pro Ala Gly Thr Ala Ser Pro Asn Leu Gly		
640	645	650
Pro Trp Lys Ser Pro Pro Pro His His Xaa Ser Ala Leu Thr Leu		
655	660	665
Gly Phe His Gly Pro His Ser Thr Ala Ser Pro Thr Xaa Ala Cys		
670	675	680
Asp Leu Gly Thr Lys Gly Gly Val Pro Arg Leu Leu Xaa Leu Ser		
685	690	695
Arg Gly Ser Gly His Val Gln Gly Gly Ala Gly Trp Pro Gly Gly		
700	705	710

Ser Ala His Pro Pro Ala Phe Pro Gln Gly Val Leu Arg Ser Lys

715

720

725

Ile Leu Glu Gln Ser Asp Pro Ser Pro Lys Ala Leu Leu Ser Ala

730

735

740

Gly Gln Cys Gln Pro Ile Pro Gly His Leu Ala Pro Gly Asp Val

745

750

755

Gly Pro Xaa

配列番号:45

配列の長さ: 746 核酸

配列の型: 核酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 核酸

配列

CGTATGTCAC TCCATTCCAA ACTCGTTCAT GGTATCATAA ATATCAACAC ATTTACGCTC	60
CACTCCTCTA TGGTATTTAC ACACTCAAAT ATCGTACTCA AGATTGGGAA GCTTTTGTA	120
AGGATGGTAA AAATGGTGCA ATTCGTGTGA GTGTCGCCAC AAATTTGAT AAGGCCGCTT	180
ACGTCATTGG TAAATTGTCT TTTGTTTTCT TCCGTTTCAT CCTTCCACTC CGTTATCATA	240
GCTTTACAGA TTTAATTTGT TATTTCTCA TTGCTGAATT CGTCTTTGGT TGGTATCTCA	300
CAATTAATTT CCAAGTTAGT CATGTCGCTG AAGATCTCAA ATTCTTTGCT ACCCCTGAAA	360
GACCAGATGA ACCATCTCAA ATCAATGAAG ATTGGGCAAT CCTTCAACTT AAAACTACTC	420
AAGATTATGG TCATGGTTCA CTCCTTTGTA CCTTTTTAG TGGTTCTTTA AATCATCAAG	480
TTGTTTCATCA TTTATTCCCA TCAATTGCTC AAGATTTCTA CCCACAACCT GTACCAATTG	540
TAAAAGAAGT TTGTAAAGAA CATAACATTA CTTACCACAT TAAACCAAAC TTCACTGAAG	600
CTATTATGTC ACACATTAAT TACCTTTACA AAATGGGTAA TGATCCAGAT TATGTTAAAA	660
AACCATAGC CTCAAAAGAT GATTAAATGA AATAACTTAA AAACCAATTA TTTACTTTTG	720
ACAAACAGTA ATATTAATAA ATACAA	746

配列番号:46

配列の長さ: 227 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Tyr	Val	Thr	Pro	Phe	Gln	Thr	Arg	Ser	Trp	Tyr	His	Lys	Tyr	Gln
1				5					10					15
His	Ile	Tyr	Ala	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Leu	Lys	Tyr
				20					25					30
Arg	Thr	Gln	Asp	Trp	Glu	Ala	Phe	Val	Lys	Asp	Gly	Lys	Asn	Gly
				35					40					45
Ala	Ile	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Asn	Phe	Asp	Lys	Ala	Ala	Tyr
				50					55					60
Val	Ile	Gly	Lys	Leu	Ser	Phe	Val	Phe	Phe	Arg	Phe	Ile	Leu	Pro
				65					70					75
Leu	Arg	Tyr	His	Ser	Phe	Thr	Asp	Leu	Ile	Cys	Tyr	Phe	Leu	Ile
				80					85					90
Ala	Glu	Phe	Val	Phe	Gly	Trp	Tyr	Leu	Thr	Ile	Asn	Phe	Gln	Val
				95					100					105
Ser	His	Val	Ala	Glu	Asp	Leu	Lys	Phe	Phe	Ala	Thr	Pro	Glu	Arg
				110					115					120
Pro	Asp	Glu	Pro	Ser	Gln	Ile	Asn	Glu	Asp	Trp	Ala	Ile	Leu	Gln
				125					130					135
Leu	Lys	Thr	Thr	Gln	Asp	Tyr	Gly	His	Gly	Ser	Leu	Leu	Cys	Thr
				140					145					150

Phe Phe Ser Gly Ser Leu Asn His Gln Val Val His His Leu Phe
 155 160 165
 Pro Ser Ile Ala Gln Asp Phe Tyr Pro Gln Leu Val Pro Ile Val
 170 175 180
 Lys Glu Val Cys Lys Glu His Asn Ile Thr Tyr His Ile Lys Pro
 185 190 195
 Asn Phe Thr Glu Ala Ile Met Ser His Ile Asn Tyr Leu Tyr Lys
 200 205 210
 Met Gly Asn Asp Pro Asp Tyr Val Lys Lys Pro Leu Ala Ser Lys
 215 220 225
 Asp Asp Xaa

配列番号 47

配列の長さ: 494 核酸

配列の型: 核酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 核酸

配列

TTTTGGAAGG NTCCAAGTTN ACCACGGANT NGGCAAGTTN ACGGGGCGGA AANCGGTTTT 60
 CCCCCAAGC CTTTTGTCGA CTGGTTCTGT GGTGGCTTCC AGTACCAAGT CGACCACCAC 120
 TTATTCCTCCA GCCTGCCCCG ACACAATCTG GCCAAGACAC ACGCACTGGT CGAATCGTTC 180
 TGCAAGGAGT GGGGTGTCCA GTACCACGAA GCCGACCTCG TGGACGGGAC CATGGAAGTC 240
 TTGCACCATT TGGGCAGCGT GGCCGGCGAA TTCGTCGTGG ATTTTGTACG CGACGGACCC 300
 GCCATGTAAT CGTCGTTCTG GACGATGCAA GGGTTCACGC ACATCTACAC AACTCACTC 360
 ACACAACTAG TGTAACCTCG ATAGAATTCT GTGTCGACCT GGACCTTGTT TGA CTGTTG 420
 GGGATAGGGT AGGTAGGCGG ACGCGTGGGT CGNCCCCGGG AATTCTGTGA CCGGTACCTG 480
 GCCCGCGTNA AAGT 494

配列番号:48

配列の長さ: 87 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Phe	Trp	Lys	Xaa	Pro	Ser	Xaa	Pro	Arg	Xaa	Xaa	Gln	Val	Xaa	Gly
1				5					10					15
Ala	Glu	Xaa	Gly	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Phe	Val	Asp	Trp	Phe	Cys
				20					25					30
Gly	Gly	Phe	Gln	Tyr	Gln	Val	Asp	His	His	Leu	Phe	Pro	Ser	Leu
				35					40					45
Pro	Arg	His	Asn	Leu	Ala	Lys	Thr	His	Ala	Leu	Val	Glu	Ser	Phe
				50					55					60
Cys	Lys	Glu	Trp	Gly	Val	Gln	Tyr	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Val	Asp
				65					70					75
Gly	Thr	Met	Glu	Val	Leu	His	His	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Gly	Glu
				65					70					75
Phe	Val	Val	Asp	Phe	Val	Arg	Asp	Gly	Pro	Ala	Met			
				80					85					

配列番号:49

配列の長さ: 520 核酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 核酸

配列

```

GGATGGAGTT CGTCTGGATC GCTGTGCGCT ACGCGACGTG GTTTAAGCGT CATGGGTGCG 60
CTTGGGTACA CGCCGGGGCA GTCGTTGGGC ATGTACTTGT GCGCCTTTGG TCTCGGCTGC 120
ATTTACATTT TTCTGCAGTT CGCCGTAAGT CACACCCATT TGCCCGTGAG CAACCCGGAG 180
GATCAGCTGC ATTGGCTCGA GTACGCGCGG ACCACACTGT GAACATCAGC ACCAAGTCGT 240
GGTTTGTAC ATGGTGGATG TCGAACCTCA ACTTTCAGAT CGAGCACCAC CTTTTCCTCA 300
CGGCGCCCCA GTTCCGTTTC AAGGAGATCA GCCCGCGCGT CGAGGCCCTC TTCAAGCGCC 360
ACGGTCTCCC TTACTACGAC ATGCCCTACA CGAGCGCCGT CTCCACCACC TTTGCCAACC 420
TCTACTCCGT CGGCCATTCC GTCGGCGACG CCAAGCGCGA CTAGCCTCTT TTCCTAGACC 480
TTAATTCCCC ACCCCACCCC ATGTTCTGTC TTCCTCCCGC 520

```

配列番号: 50

配列の長さ: 153 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```

Met Glu Phe Val Trp Ile Ala Val Arg Tyr Ala Thr Trp Phe Lys
1           5           10           15
Arg His Gly Cys Ala Trp Val His Ala Gly Ala Val Val Gly His
           20           25           30
Val Leu Val Arg Leu Trp Ser Arg Leu His Leu His Phe Ser Ala
           35           40           45
Val Arg Arg Lys Ser His Pro Phe Ala Arg Glu Gln Pro Gly Gly
           50           55           60

```

Ser Ala Ala Leu Ala Arg Val Arg Ala Asp His Thr Val Asn Ile			
	65	70	75
Ser Thr Lys Ser Trp Phe Val Thr Trp Trp Met Ser Asn Leu Asn			
	80	85	90
Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Ala Pro Gln Phe Arg			
	95	100	105
Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu Phe Lys Arg His			
	110	115	120
Gly Leu Pro Tyr Tyr Asp Met Pro Tyr Thr Ser Ala Val Ser Thr			
	125	130	135
Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly Asp Ala			
	140	145	150
Lys Arg Asp			

配列番号:51

配列の長さ: 429 核酸

配列の型: 核酸

鎖の数: 無関係

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 核酸

配列

ACGCGTCCGC CCACGCGTCC GCCGCGAGCA ACTCATCAAG GAAGGCTACT TTGACCCCTC	60
GCTCCCGCAC ATGACGTACC GCGTGGTCGA GATTGTTGTT CTCTTCGTGC TTTCCTTTTG	120
GCTGATGGGT CAGTCTTCAC CCCTCGCGCT CGCTCTCGGC ATTGTCGTCA GCGGCATCTC	180
TCAGGGTCGC TCGGGCTGGG TAATGCATGA GATGGGCCAT GGGTCGTTCA CTGGTGTCAT	240
TTGGCTTGAC GACCGGTTGT GCGAGTTCTT TTACGGCGTT GGTTGTGGCA TGAGCGGTCA	300
TTACTGGA AAACAGCACA GCAAACACCA CGCAGCGCCA AACCGGCTCG AGCACGATGT	360
AGATCTCAAC ACCTTGCCAT TGGTGGCCTT CAACGAGCGC GTCGTGCGCA AGGTCCGACC	420

配列

125

【図1】

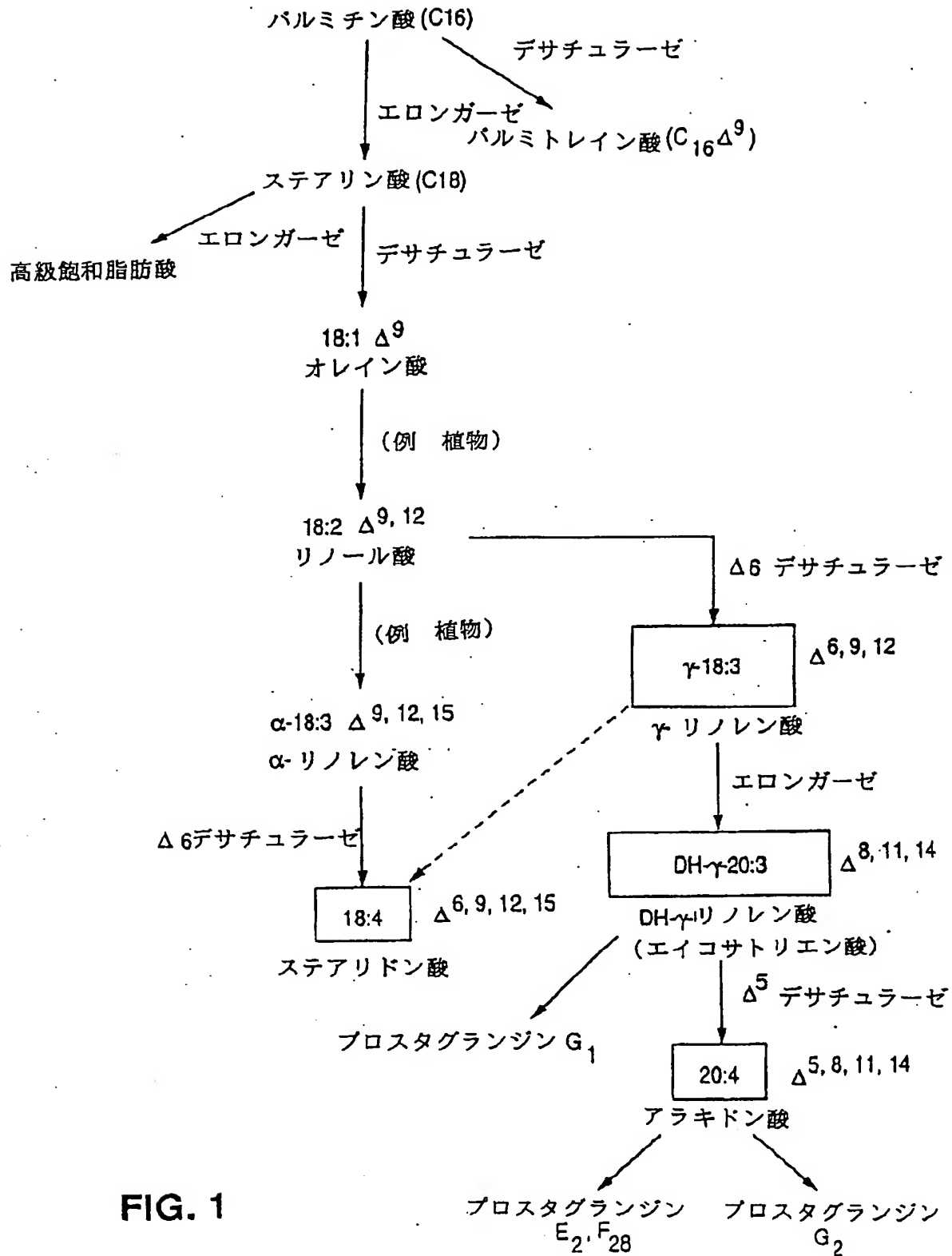


FIG. 1

【図2】

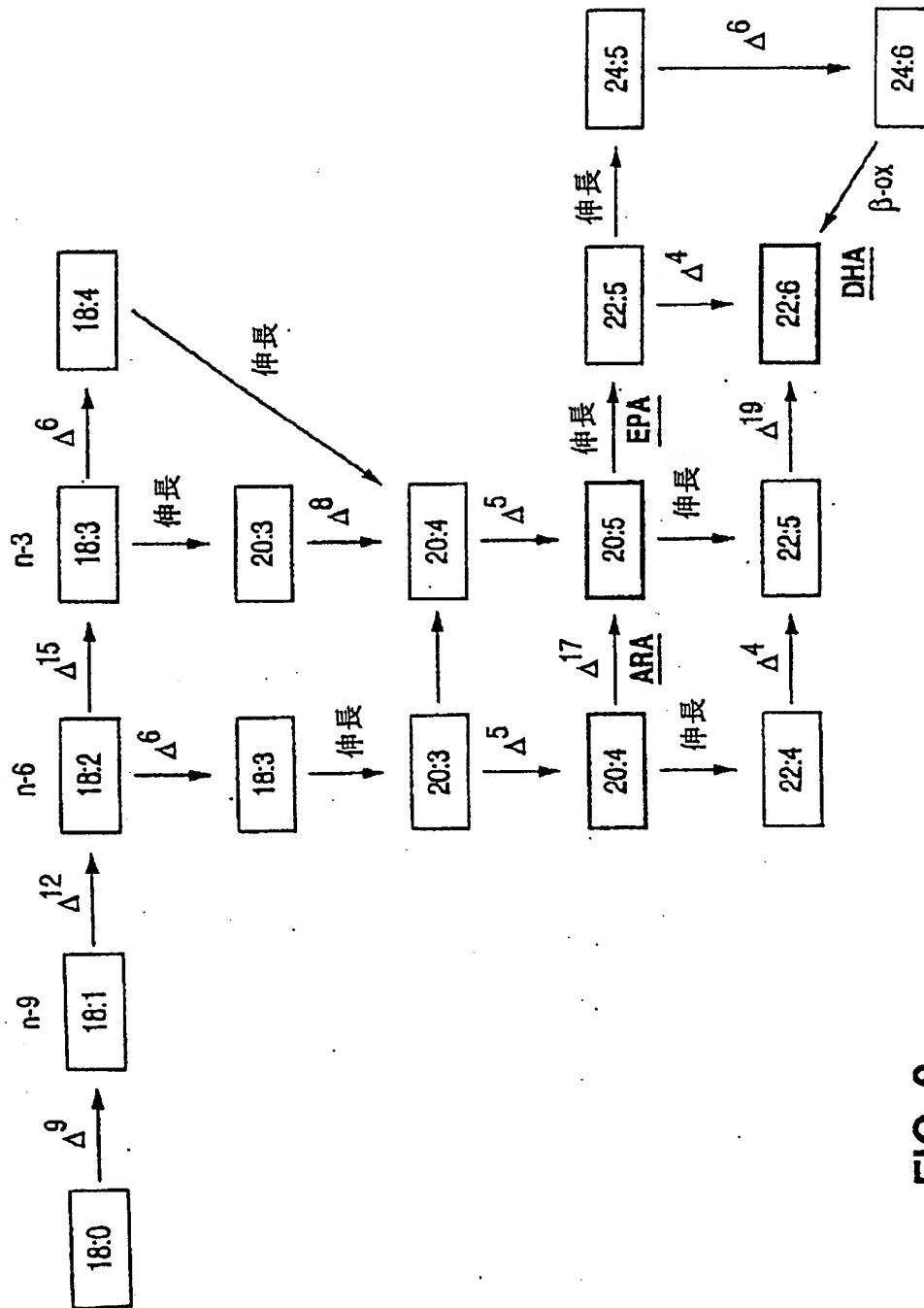


FIG. 2

[図 3]

60
 CGACACTCCT TCGTTCTTCT CACCCGTCCT AGTCCCTTC AACCCCTC TTTGACAAAG
 ACAACAAACC ATG GCT GCT GCT CCC AGT GTG AGG ACG TTT ACT CGG GCC GAG
 Met Ala Ala Pro Ser Val Arg Thr Phe Thr Arg Ala Glu
 120
 GTT TTG AAT GCC GAG GCT CTG AAT GAG GGC AAG AAG GAT GCC GAG GCA
 Val Leu Asn Ala Glu Ala Leu Asn Glu Gly Lys Lys Asp Ala Glu Ala
 180
 CCC TTC TTG ATG ATC ATC GAC AAC AAG GTG TAC GAT GTC CGC GAG TTC
 Pro Phe Leu Met Ile Ile Asp Asn Lys Val Tyr Asp Val Arg Glu Phe
 240
 GTC CCT GAT CAT CCC GGT GGA AGT GTG ATT CTC ACG CAC GTT GGC AAG
 Val Pro Asp His Pro Gly Gly Ser Val Ile Leu Thr His Val Gly Lys
 300
 GAC GGC ACT GAC GTC TTT GAC ACT TTT CAC CCC GAG GCT GCT TGG GAG
 Asp Gly Thr Asp Val Phe Asp Thr Phe His Pro Glu Ala Ala Trp Glu
 360
 ACT CTT GCC AAC TTT TAC GTT GGT GAT ATT GAC GAG AGC GAC CGC GAT
 Thr Leu Ala Asn Phe Tyr Val Gly Asp Ile Asp Glu Ser Asp Arg Asp
 ATC AAG AAT GAT GAC TTT GCG GCC GAG GTC CGC AAG CTG CGT ACC TTG
 Ile Lys Asn Asp Phe Ala Ala Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu

FIG. 3A

【図 3】

420 *											
TTC	CAG	TCT	CTT	GGT	TAC	TAC	GAT	TCT	TCC	AAG	GCA
Phe	Gln	Ser	Leu	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Lys	Ala
											Tyr
											Ala
											Phe
480 *											
AAG	GTC	TCG	TTC	AAC	CTC	TGC	ATC	TGG	GGT	TTG	TCG
Lys	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Cys	Ile	Trp	Gly	Leu	Ser
											Thr
											Val
											Ile
											Val
540 *											
GCC	AAG	TGG	GGC	CAG	ACC	TCG	ACC	CTC	GCC	AAC	GTG
Ala	Lys	Trp	Gly	Gln	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Val
											Ser
											Ala
											Ala
											GCG
600 *											
CTT	TTG	GGT	CTG	TTC	TGG	CAG	CAG	TGC	GGA	TGG	TTG
Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Trp	Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu
											Ala
											His
											Asp
											Phe
660 *											
TTG	CAT	CAC	CAG	GTC	TTC	CAG	GAC	CGT	TTC	TGG	GGT
Leu	His	His	Gln	Val	Phe	Gln	Asp	Arg	Phe	Trp	Gly
											Asp
											Phe
											Gly
											GGC
720 *											
GCC	TTT	TTG	GGA	GGT	GTC	TGC	CAG	GGC	TTC	TCG	TCC
Ala	Phe	Leu	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Phe	Ser	Ser
											Trp
											Trp
											Lys
											AAG
780 *											
GAC	AAG	CAC	AAC	ACT	CAC	CAC	GCC	GCC	CCC	AAC	GTC
Asp	Lys	His	Asn	Thr	His	His	Ala	Ala	Pro	Asn	Val
											His
											Gly
											GAG
											Glu
											Asp

FIG. 3B

[図3]

CCC Pro	GAC Asp	ATT Ile	GAC Asp	ACC Thr	CAC His	CCT Pro	CTG Leu	TTG Leu	ACC Thr	TGG Trp	AGT Ser	GAG Glu	CAT His	GCG Ala	TTG Leu
GAG Glu	ATG Met	TTC Phe	TCG Ser	GAT Asp	GTC Val	CCA Pro	GAT Asp	GAG Glu	GAG Glu	CTG Leu	ACC Thr	CGC Arg	ATG Met	TGG Trp	TCG Ser
CGT Arg	TTC Phe	ATG Met	GTC Val	CTG Leu	AAC Asn	CAG Gln	ACC Thr	TGG Trp	TTT Phe	TAC Tyr	TTC Phe	CCC Pro	ATT Ile	CTC Leu	TCG Ser
TTT Phe	GCC Ala	CGT Arg	CTC Leu	TCC Ser	TGG Trp	TGC Cys	CTC Leu	CAG Gln	TCC Ser	ATT Ile	CTC Leu	TTT Phe	GTG Val	CTG Leu	CCT Pro
AAC Asn	GGT Gly	CAG Gln	GCC Ala	CAC His	AAG Lys	CCC Pro	TCG Ser	GGC Gly	GCG Ala	CGT Arg	GTG Val	CCC Pro	ATC Ile	TCG Ser	TTG Leu
GTC Val	GAG Glu	CAG Gln	CTG Leu	TCG Ser	CTT Leu	GCG Ala	ATG Met	CAC His	TGG Trp	ACC Thr	TGG Trp	TAC Tyr	CTC Leu	GCC Ala	ACC Thr
ATG Met	TTC Phe	CTG Leu	ATC Ile	AAG Lys	GAT Asp	CCC Pro	CCC Pro	GTC Val	AAC Asn	ATG Met	CTG Leu	GTG Val	TAC Tyr	TTT Phe	TTG Leu
GTG Val	TCG Ser	CAG Gln	GCG Ala	GTG Val	TGC Cys	GGA Gly	AAC Asn	TTG Leu	TTG Leu	GCG Ala	ATC Ile	GTG Val	TTC Phe	TCG Ser	CTC Leu

FIG. 3C

【図 3】

1140															
AAC	CAC	AAC	GGT	ATG	CCT	GTG	ATC	TCG	AAG	GAG	GAG	GCG	GTC	GAT	ATG
Asn	His	Asn	Gly	Met	Pro	Val	Ile	Ser	Lys	Glu	Glu	Ala	Val	Asp	Met
1200															
GAT	TTC	TTC	ACG	AAG	CAG	ATC	ATC	ACG	GGT	CGT	GAT	GTC	CAC	CCG	GGT
Asp	Phe	Phe	Thr	Lys	Gln	Ile	Ile	Thr	Gly	Arg	Asp	Val	His	Pro	Gly
1260															
CTA	TTT	GCC	AAC	TGG	TTC	ACG	GGT	GGA	TTG	AAC	TAT	CAG	ATC	GAG	CAC
Leu	Phe	Ala	Asn	Trp	Phe	Thr	Gly	Gly	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ile	Glu	His
1320															
CAC	TTG	TTC	CCT	TCG	ATG	CCT	CGC	CAC	AAC	TTT	TCA	AAG	ATC	CAG	CCT
His	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Pro	Arg	His	Asn	Phe	Ser	Lys	Ile	Gln	Pro
1380															
GCT	GTC	GAG	ACC	CTG	TGC	AAA	AAG	TAC	AAT	GTC	CGA	TAC	CAC	ACC	ACC
Ala	Val	Glu	Thr	Leu	Cys	Lys	Lys	Tyr	Asn	Val	Arg	Tyr	His	Thr	Thr
1440															
GGT	ATG	ATC	GAG	GGA	ACT	GCA	GAG	GTC	TTT	AGC	CGT	CTG	AAC	GAG	GTC
Gly	Met	Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Glu	Val	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Glu	Val
1500															
TCC	AAG	GCT	GCC	TCC	AAG	ATG	GGT	AAG	GCG	CAG	TAAAAAAA	AAACAAGGAC			
Ser	Lys	Ala	Ala	Ser	Lys	Met	Gly	Lys	Ala	Gln					

FIG. 3D

【図3】

1500
GTTTTTTTC GCCAGTGCCT GTGCCTGTGC CTGCTTCCCT TGTCAAGTCG AGCGTTTCTG
1560
GAAAGGATCG TTCAGTGCAG TATCATCATT CTCCTTTTAC CCCCCGCTCA TATCTCATT
ATTTCICTTA TTAAACAAC TGTTCCTCCCC TTCACCG

FIG. 3E

【図4】

Ma524	EVRLRLTLFQSLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTVIVAKWGGTSTLANVLSAALLGL	90
ATTS4723VTLY.TLAFVAAAMSLGVLYGVLACPSVXPHQIAAGLLGL	38
12-5GVLGVLACTSVFAHQIAAALLGL	24
T42806GXX.....	4
W28140	1
R05219C.....	2
W53753	1

Ma524	FWQQCGWLAHDFLHHQVFQDRFWGDLFGAFLGGVC-QGFSSSWWKDKHNTTHAAPNVHGE	119
ATTS4723	LWIQSAYIGXD SGHYVIMSNKSNX-FAQLLSGNC LTGI IAWWKWT HN AHHLACN SLDY	97
12-5	LWIQSAYIGHD SGHYVIMSNKSNR-FAQLLSGNC LTGIS IAWWKWT HN AHHLACN SLDY	83
T42806	4
W28140	1
R05219	2
W53753	1

Ma524	DPDIDTHPLLTTWSEHALEMFSFSDVPDEELTRMWS-...RFMYLNQTWFFPILSFARLSW	174
ATTS4723	GPNLQH IIP	105
12-5	DPDLQH IIPVFAVSTK--FESLTSRFDYDRKLTFGPVARFVSYQHFTYYPVVMCFGRINL	140
T42806	4
W28140	1
R05219	2
W53753	1

FIG. 4A

【図4】

Ma524	CLQSILFVLPNGQAHKPSGARVPISLVEQLSLAM	-----HWTWYLATMFLFIKDPVNMLV	229
ATTS4723		W W	105
12-5	FIQTFLLF SKRE	-----VDPDRALNFAGILV-----FWTWFF--PLLVSCLPNWPERF	185
T42806		-----NFAGILV-----FETVF--PLLVSCLPNWPERF	29
W28140		-----PATEVGGLAWMIT-Y-RFFLTYYVPLLGLKAF	33
R05219		-----F-S-----	2
W53753		-----RHEAARGGTRLAYMLVCMQWTDL--LWAAS Y RFFLSYSPFYGATGT	48
Ma524	YFLVSQAVCGNLLAIVFSLNHNHGMPIVSKEEAVDMDFFTKQIITGRDVHPGLFANWFTGG		289
ATTS4723			105
12-5	FFVFTSFTVTA[LQHIT]Q[FT]LNHF[AAD]VYV-GPPTGSDWFEKQAAAGTI[DI]SCRSYMDWFFFGG		244
T42806	XFVFTGFTVTA[LQHI]Q[FT]LNHF[AAD]VYV-GPPTGSDWFEKQAAAGTI[DI]SCRSYMDWFFFGG		88
W28140	LFIVRFLES[NWFV]V[TQMNH]--IPMHIDHDRNMDWVSTQ[LQATCNV]HKS[A]FNIDWFSGH		90
R05219		-----SPKSSPT[RNM]T[PS]PFI[DWLWGG]	23
W53753	LFVAVRVLESHWFVWITQMNH]--IPKEIGHEKHRD[WASSQ]LAATCN[V]EP[S]LFDWFSGH		105
Ma524	LNYQIEHHLFPSMPRRHNFSKIQPAVETLCKKYNVRYHTTGMIEGTAEVESRLNEVSKAAS		349
ATTS4723			105
12-5	LQFQLEHH		252
T42806	LQFQLEHHLFPPR[PR]CHLR[K]VS[P]VGQRGFORKXNLSX		125
W28140	LN[FQ]IEHHLFPTMPRRHNYHXVAPL[VQS]LCA[K]HGIE[YQSKPL		131
R05219	LNYQIEHHLFPTMPR[C]NLNRCMKYVKEWCAEN[N]LPYLVDYFV[G]YNLNLOQ[L]KNMAELVQ		83
W53753	LN[FQ]IEHHLFPTMPRRHNYRXVAPL[V]KAFCA[K]HGLHYEV		143
Ma524	KMGKAQ		355
ATTS4723			105
12-5			252
T42806			125
W28140			131
R05219			87
W53753			148

-- A[K]A

FIG. 4B

【図5】

60
 GTCCCTGTC GCTGTGGCA CACCCCATCC TCCCTCGCTC CCTCTGCGTT TGTCCTTGGC
 120
 CCACCGTCTC TCCTCCACCC TCCGAGACGA CTGCAACTGT AATCAGGAAC CGACAAATAC
 180
 ACGATTTCTT TTTACTCAGC ACCAACTCAA AATCCTCAAC CGCAACCCCTT TTTCAGG ATG
 *
 GCA CCT CCC AAC ACT ATC GAT GCC GGT TTG ACC CAG CGT CAT ATC AGC
 Ala Pro Pro Asn Thr Ile Asp Ala Gly Leu Thr Gln Arg His Ile Ser
 240
 ACC TCG GCC CCA AAC TCG GCC AAG CCT GCC TTC GAG CGC AAC TAC CAG
 Thr Ser Ala Pro Asn Ser Ala Lys Pro Ala Phe Glu Arg Asn Tyr Gln
 300
 CTC CCC GAG TTC ACC ATC AAG GAG ATC CGA GAG TGC ATC CCT GCC CAC
 Leu Pro Glu Phe Thr Ile Lys Glu Ile Arg Glu Cys Ile Pro Ala His
 360
 TGC TTT GAG CGC TCC GGT CTC CGT GGT CTC TGC CAC GTT GCC ATC GAT
 Cys Phe Glu Arg Ser Gly Leu Arg Gly Leu Cys His Val Ala Ile Asp
 420
 CTG ACT TGG GCG TCG CTC TTG TTC CTG GCT GCG ACC CAG ATC GAC AAG
 Leu Thr Trp Ala Ser Leu Leu Phe Leu Ala Ala Thr Gln Ile Asp Lys
 TTT GAG AAT CCC TTG ATC CGC TAT TTG GCC TGG CCT GTT TAC TGG ATC
 Phe Glu Asn Pro Leu Ile Arg Tyr Leu Ala Trp Pro Val Tyr Trp Ile

FIG. 5A

【図5】

480 ATG CAG GGT ATT GTC TGC ACC GGT GTC TGG GTG CTG GCT CAC GAG TGT
 Met Gln Gly Ile Val Cys Thr Gly 540* Val Trp Val Leu Ala His Glu Cys

 GGT CAT CAG TCC TTC TCG ACC TCC AAG ACC CTC AAC AAC ACA GTT GGT
 Gly His Gln Ser Phe Ser Thr Ser Lys Thr Leu 600* Asn Asn Thr Val Gly

 TGG ATC TTG CAC TCG ATG CTC TTG GTC CCC TAC CAC TCC TGG AGA ATC
 Trp Ile Leu His Ser Met Leu Leu Val Val Tyr His Ser Trp Arg Ile 660*

 TCG CAC TCG AAG CAC CAC AAG GCC ACT GGC CAT ATG ACC AAG GAC CAG
 Ser His Ser Lys His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Lys Asp Gln

 GTC TTT GTG CCC AAG ACC CGC TCC CAG GTT GGC TTG CCT CCC AAG GAG
 Val Phe Val Pro Lys Thr Arg Ser Ser Gln Val Gly Leu Pro Pro Lys Glu
 720*

 AAC GCT GCT GCT GCC GTC CAG GAG GAG GAC ATG TCC GTG CAC CTG GAT
 Asn Ala Ala Ala Ala Val Gln Glu Glu Asp Met Ser Val His Leu Asp 780*

 GAG GAG GCT CCC ATT GTG ACT TTG TTC TGG ATG GTG ATC CAG TTC TTG
 Glu Glu Ala Pro Ile Val Thr Leu Phe Trp Met Val Ile Gln Phe Leu 840*

 TTC GGA TGG CCC GCG TAC CTG ATT ATG AAC GCC TCT GGC CAA GAC TAC
 Phe Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Ile Met Asn Ala Ser Gly Gln Asp Tyr

FIG. 5B

[illegible]

FIG. 5C

【図5】

```

1260      GAA GCT ACC TAT CAT CTC AAG AAA CTG CTG GGA GAG TAC TAT GTG TAC
      Glu Ala Thr Tyr His Leu Lys Lys Leu Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Tyr

      GAC CCA TCC CCG ATC GTC GTC GCG GTT GCG AGG TCG TTC CGT GAG TGC
      Asp Pro Ser Pro Ile Val Val Ala Val Trp Arg Ser Phe Arg Glu Cys
1320
      CGA TTC GTG GAG GAT CAG GGA GAC GTG GTC TTT TTC AAG AAG TAAAAA
      Arg Phe Val Glu Asp Gln Gly Asp Val Val Phe Phe Lys Lys
1380
      AAAAGACAAT GGACCACACA CAACCTTGTC TCTACAGACC TACGTATCAT GTAGCCATAC
1440
      CACTTCATAA AAGAACATGA GCTCTAGAGG CGTGTTCATTC GCGCCTCC

```

FIG. 5D

10	20	30	40	50	60
LHHTYTNIA	ADPDVSTSEP	DVRRIKPNQK	WVFNHINQHM	FVPFLYGLLA	FKVRIQDINI*
70	80	90	100	110	120
LYFVKTNDAI	RVNPISTWHT	VMFWGGKAFF	VWYRLIVPLQ	YLPLGKVLLL	FTVADMVSSY*
130	140	150	160	170	180
WLALTFQANY	VVEEVQWPLP	DENGIIQKDW	AAMQVETTQD	YAHDSHLWTS	ITGSLNYQXV*
HHLFPH					

FIG. 6

[図7]

GCTTCCTCCA GTTCATCCTC CATTTCGCCA CCTGCATTCT TTACGACCGT TAAGCAAG
 60
 ATG GGA ACG GAC CAA GGA AAA ACC TTC ACC TGG GAA GAG CTG GCG GCC
 met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
 120
 CAT AAC ACC AAG GAC GAC CTA CTC TTG GCC ATC CGC GGC AGG GTG TAC
 His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr
 180
 GAT GTC ACA AAG TTC TTG AGC CGC CAT CCT GGT GGA GTG GAC ACT CTC
 Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Val Asp Thr Leu
 240
 CTG CTC GGA GCT GGC CGA GAT GTT ACT CCG GTC TTT GAG ATG TAT CAC
 Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His
 300
 GCG TTT GGG GCT GCA GAT GCC ATT ATG AAG AAG TAC TAT GTC GGT ACA
 Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr
 360
 CTG GTC TCG AAT GAG CTG CCC ATC TTC CCG GAG CCA ACG GTG TTC CAC
 Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His
 AAA ACC ATC AAG ACG AGA GTC GAG GGC TAC TTT ACG GAT CGG AAC ATT
 Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asn Ile

FIG. 7A

【図7】

420									
GAT	CCC	AAG	AAT	AGA	CCA	GAG	ATC	TGG	GGA
Asp	Pro	Lys	Asn	Arg	Pro	Glu	Ile	Trp	Gly
									CGA
									Arg
									Tyr
									Ala
									GCT
									Leu
									CTT
									ATC
									Ile
									Phe
									TTT
480									
GGA	TCC	TTG	ATC	GCT	TCC	TAC	TAC	GCG	CAG
Gly	Ser	Leu	Ile	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Gln
									Leu
									CTC
									GTT
									Val
									Phe
									Pro
									Val
									TTT
									GGA
									Gly
									Phe
540									
GTC	GAA	CGC	ACA	TGG	CTT	CAG	GTG	GTG	TTT
Val	Glu	Arg	Thr	Trp	Leu	Gln	Val	Val	Phe
									Ala
									His
									Ser
									Ala
									Asp
									His
									Val
									Pro
									His
									Val
									Ala
									Asn
									Thr
									Ala
									Gly
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asn
									Thr
									Ala
									Gly
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp
									Pro
									Val
									Ala
									Asp

[図7]

TCG Ser	ACG Thr	TCT Ser	GAG Glu	CCC Pro	GAT Asp	GTT Val	CGT Arg	CTC Arg	ATC Ile	AAG Lys	CCC Pro	AAC Asn	CAA Gln	AAG Lys	TGG Trp
780															
TTT Phe	GTC Val	AAC Asn	CAC His	ATC Ile	AAC Asn	CAG Gln	CAC His	ATG Met	TTT Phe	GTT Val	CCT Pro	TTC Phe	CTG Leu	TAC Tyr	GGA Gly
CTG Leu	CTG GCG	Ala	Phe	TTC AAG	Lys Val	Arg Ile	ATT Ile	CAG Gln	GAC Asp	ATC Ile	AAC Asn	ATT Ile	TTG Leu	TAC Tyr	TTT Phe
GTC Val	AAG Lys	Thr	Asn	AAT Asp	GAC Asp	GCT Ala	ATT Ile	CGT Arg	GTC Val	AAT Asn	CCC Pro	ATC Ile	TCG Thr	TGG Trp	CAC His
ACT Thr	GTG Val	ATG Met	Phe	TTC Phe	TGG Trp	GCG Gly	GCG Gly	AAG Lys	GCT Ala	TTC Phe	TTT Phe	GTC Val	TGG Trp	TAT Tyr	CTG Leu
ATT Ile	GTT Val	CCC Pro	CTG Leu	CAG Gln	TAT Tyr	CTG Leu	CCC Pro	CTG Leu	GCG Gly	AAG Lys	GTG Val	CTG Leu	CTC Leu	TTG Leu	TTC Phe
1020															
ACG Thr	GTC Val	GCG Ala	GAC Asp	ATG Met	GTG Val	TCG Ser	TCT Ser	TAC Tyr	TGG Trp	CTG Leu	GCG Ala	CTG Leu	ACC Thr	TTC Phe	CAG Gln

FIG. 7C

【図7】

1080 GCG AAC CAC GTT GTT GAG GAA GTT CAG TGG CCG TTG CCI GAC GAG AAC
 Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn
 1140
 GGG ATC ATC CAA AAG GAC TGG GCA GCT ATG CAG GTC GAG ACT ACG CAG
 Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Thr Thr Gln
 1200
 GAT TAC GCA CAC GAT TCG CAC CTC TGG ACC AGC ATC ACT GGC AGC TTG
 Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu
 AAC TAC CAG GCT GTG CAC CAT CTG TTC CCC AAC GTG TCG CAG CAC CAT
 Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His
 1260
 TAT CCC GAT ATT CTG GCC ATC ATC AAG AAC ACC TGC AGC GAG TAC AAG
 Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys
 1320
 GTT CCA TAC CTT GTC AAG GAT ACG TTT TGG CAA GCA TTT GCT TCA CAT
 Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His
 1380
 TTG GAG CAC TTG CGT GTT CTT GGA CTC CGT CCC AAG GAA GAG TAGA
 Leu Glu his Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu
 1440
 AGAAAAAAG CGCCGAATGA AGTATTGCC CCTTTTCTC CAAGAATGGC AAAAGGAGAT
 CAAGTGGACA TTCTCTATGA AGA

FIG. 7D

【図8】

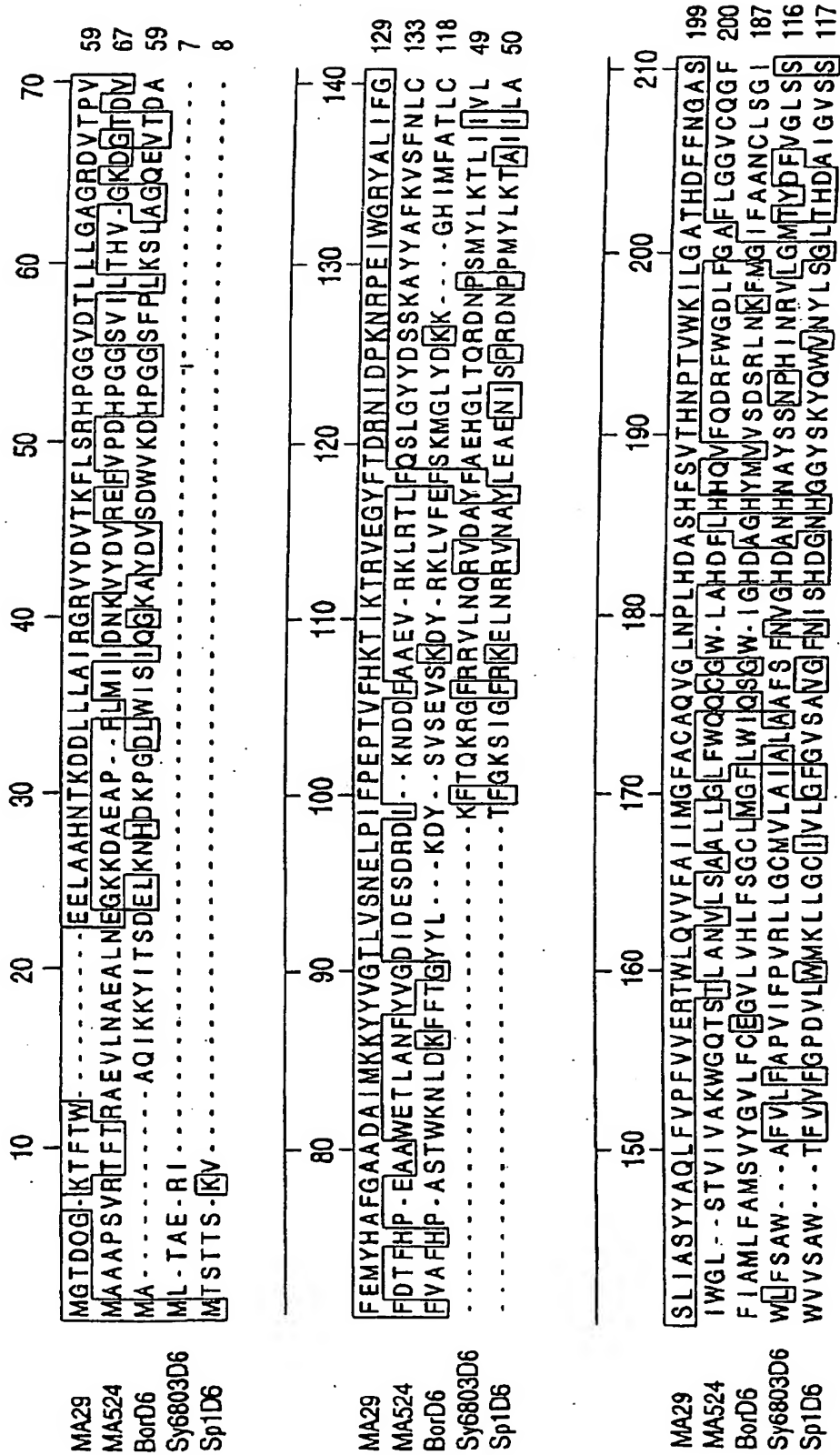


FIG. 8A

【図8】

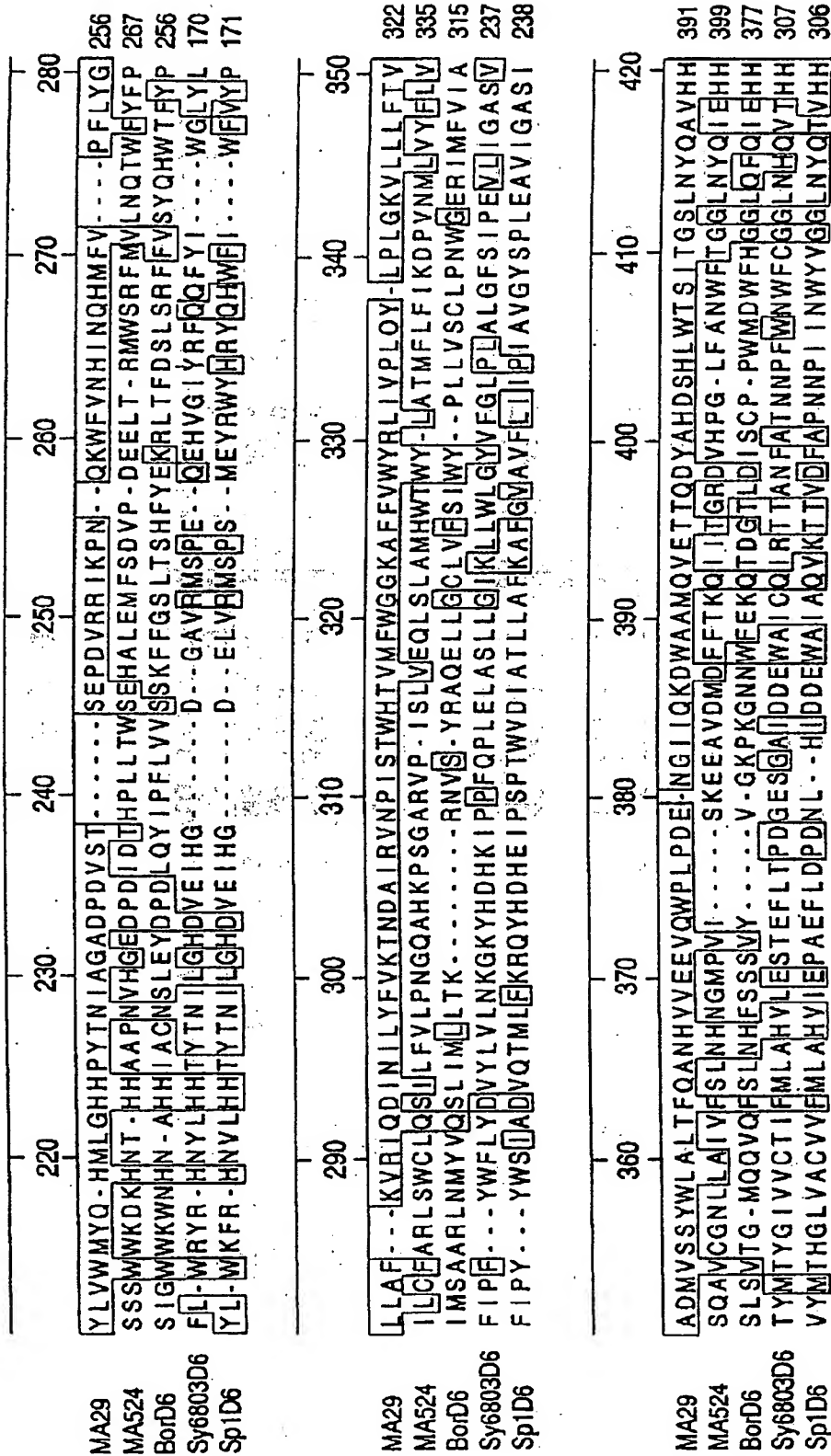
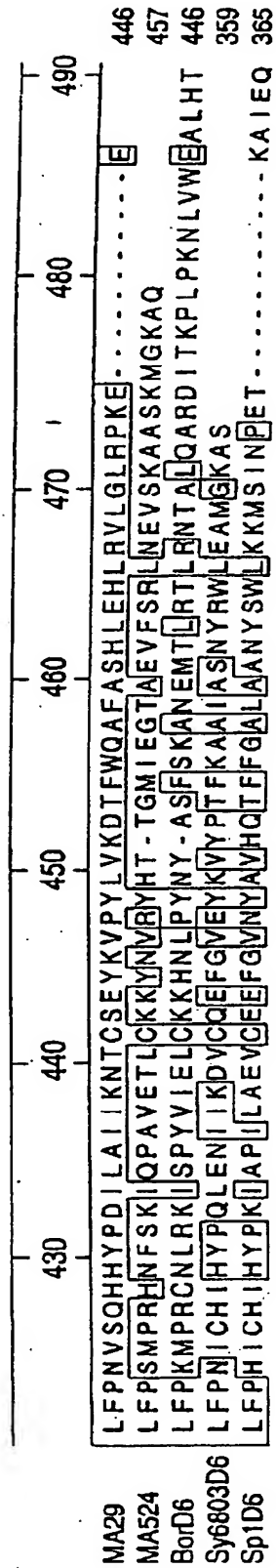


FIG. 8B

FIG. 8C



SCORES INIT1: 117 INTN: 225 OPT: 256
SMITH-WATERMAN SCORE: 408; 27.0% IDENTITY IN 441 aa OVERLAP

ma29gcg.pep

FSVTHNPTVWKILGATHDF----FNGASYLVWMYQHMLGHHPYTNIAGADPDVSTSE---

LSVYRKPK-WNHL--VHKFVIGHLKGASANWNNHRH-FQHAKPNI FHKDPDVNMLHVVF

FIG. 9A

【図9】

SCORES INIT1: 117 INITN: 225 OPT: 256
SMITH-WATERMAN SCORE: 408; 27.0% IDENTITY IN 441 aa OVERLAP

ma29gcg.pep	230	240	250	260	270	280
	...PDVRRIKPNQKWF-VNHINQHMV--PFLYGLLAFKVRIQDINILYFVKTNDAIRV					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
253538a	230	240	250	260	270	280
	LGEWQPIEYGKKKLYLPYNHQHEYFFLIGPPLIPMYFQYQI----IMTMIVHKNNWVDL					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
ma29gcg.pep	290	300	310	320	330	340
	NPISTWHTVMFWGGKAFFVWYRLIVPLQYPLGKVLVLLFTVADMVSSYWLALTFQANHVV					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
253538a	290	300	310	320	330	340
	----AWAVSYYI----RFFITY--IPF-YGILG-ALLFLNIRFLESHWFVWVTQMNHIV					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
ma29gcg.pep	350	360	370	380	390	
	EEVQWPLPDENGIIQKDWAAMQVETT---QDYAHDShLWTSITGSLNYQAVHHLPNPVS					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
253538a	350	360	370	380	390	
	MEI-----DQEAY--RDWFSSQLTATCNVEQSFND---WFS--GHLNFQIEHHLFPTMP					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
ma29gcg.pep	400	410	420	430	440	
	QHHYPDILAIKNTCSEYKVPYLVKDTFWQAFASHLEHLRVGLRPKEEX					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:
253538a	380	390	400	410	420	430
	RHNHLKIAPLVKSLCAKHGIEYQEKPLLRALLDIIIRSLKKSGKLWLDAYLHKX					
	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:

FIG. 9B

SCORES INIT1: 231 INITN: 499 OPT: 401
SMITH-WATERMAN SCORE: 620; 27.3% IDENTITY IN 455 aa OVERLAP

ma524gcg.pep	MAAAPSVRTFTTRAEVLNAEALNEGKKDAEAPFLMI	DNKVYDVREFVPDHPGGSVILTH-	59			
	:	: : : : : : : : :	50			
	10	20	30	40	50	
253538a	QGPTPRYFTWDEV	-----AQRSGCEERWLVIDRKVYNI	SEFTRRHPPGGSRVISHY	40	50	
	10	20	30	40	50	
ma524gcg.pep	VGKDGTDVDFTFHPEAAW--ETLANFYVGDIDE--	SDRDIKNDDFAAEVRKLRTLFQSL	110			
	: : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : :	100			
	70	80	90	100	110	
253538a	AGQDATDPFVAFHINKGLVKKYMNSLLIGELSP	EQPSFEPTKNKELTDEFRELRATVERM	110			
	60	70	80	90	100	110
ma524gcg.pep	GYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTVIVAKWGQTSTLANVLSAALLGLFWQQCGWL	AHDF	170			
	: : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : :	160			
	120	130	140	150	160	170
253538a	GLMKANHVFLLYLLHILLDGAAWLTLWVFG-TSFLPFLLC	AVLLSAVQAQAGWLQHDY	160			
	120	130	140	150	160	170
ma524gcg.pep	LHHQVFQDRFWGDLFGAFLGGVCQGFSSWWKDKHNTHHAAPNVHGEDPDIDTHPLLTWS		230			
	: : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : :	220			
	180	190	200	210	220	230
253538a	GHLSVYRKPKWNHLVHKFVIGHLKGASANNWNHRHFQHHAKPNI	FHKDPDVN---ML---	220			
	170	180	190	200	210	220

FIG. 10A

【図10】

SCORES INIT1: 231 INITN: 499 OPT: 401
SMITH-WATERMAN SCORE: 620; 27.3% IDENTITY IN 455 aa OVERLAP

ma524gcg.pap	240	250	260	270	280	290
	EHALEMFSDVPDEELTRMWSRFMVLNQTWFFPILS---FARLSWCLQSILFVLPNGQAH					
	:::	:::	:::	:::	:::	:::
253538a	-HVF-VLGEWQPIEYGKKKLYLPYNHQHEFFLIGPPLLIPMYFQYQIMTMI-----VH	230	240	250	260	270
ma524gcg.pap	300	310	320	330	340	349
	KPSGARVPISLVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIK--DPVNMLVYFLVSQAACGNNLLAIVFS					
	:::	:::	:::	:::	:::	:::
253538a	K-----NWVDLAWAVSYIRFFITYIPFYGILGALLFLNFIRFLESHWFWVWTQ	280	290	300	310	320
ma524gcg.pap	350	360	370	380	390	400
	LNHNMGMPVISKEEAVDMDFFTKQIITGRDVHPGLFANWFTGGLNYQIEHHLFPSMPRHNF					
	:::	:::	:::	:::	:::	:::
253538a	MNHI VMEI--DQEAYR-DWFSQLTATCNVEQSFNDWFSGHLNFQIEHHLFPTMPRHNL	330	340	350	360	370
ma524gcg.pap	410	420	430	440	450	
	SKIQPAVETLCKKYNVRYHTTGMIEGTAEVFSRLNEVSKAASKMGKAQX					
	:::	:::	:::	:::	:::	:::
253538a	HKIAPLVKSLCAKHGIEYQEKPLLRALLDIRSLKKSGKLWLDAYLHKX	390	400	410	420	430

FIG. 10B

【手続補正書】

【提出日】平成11年11月12日(1999.11.12)

【補正内容】

(翻訳文明細書P1、1行目からP7、13行目まで)

明細書

植物における長鎖多不飽和脂肪酸の合成のための方法および組成物

関連出願

本出願は、1997年4月11日付け米国特許出願第08/834,655号の一部継続出願であり、1997年4月11日付け米国特許出願第08/833,610号、1997年4月11日付け米国特許出願第08/834,033号、および1997年10月24日付け米国特許出願第08/956,985号の一部継続出願であり、その開示内容は本明細書中に参考として組み込まれる。

序論発明の分野

本発明は、宿主植物における長鎖多不飽和脂肪酸 (PUFAS) の産生量を変えることができる酵素および／または酵素成分のレベルのモジュレーションに関する。本発明は、植物における PUFAS の産生により例示する。

背景

多不飽和脂肪酸 (PUFA) の2つの主要ファミリーは、アラキドン酸などの ω^3 脂肪酸およびエイコサペンタエン酸などの ω^6 脂肪酸である。PUFAは細胞の形質膜の重要な成分であり、それは該形質膜においてリン脂質のような形態で見出されうる。また、PUFAは、プロスタサイクリン、ロイコトリエン、およびプロスタグランジンなどのヒトおよび動物において重要な他の分子の前駆体として機能する。PUFAは、適切な発達、特に乳幼児の脳の発達、ならびに組織の形成および修復に必要である。

重要な4つの主要長鎖PUFAには、種々のタイプの魚油中に主として見出されるドコサヘキサエン酸 (DHA) およびエイコサペンタエン酸 (EPA)、メマツヨイグサ (*Oenothera biennis*)、ルリチシャ (*Borago officinalis*) およびクロフサスグ

リ (*Ribes nigrum*) などの多数の植物の種子中に見出される γ -リノレン酸 (GLA)、ならびに海洋油および植物種子中に見出されるステアリドン酸 (SDA) が含まれる。GLAおよびもう1つの重要な長鎖PUFAであるアラキドン酸 (ARA) は共に、糸状菌中に見出される。ARAは、肝臓、副腎などの動物組織から精製することができる。

DHAに関しては、種々の海洋生物、冷水海洋魚から得た油および卵黄画分などの多数の商業的製造起源が存在する。ARAに関しては、*Mortierella*属、*Entomophthora*属、*Phytium*属および*Porphyridium*属を含む微生物を、商業的製造に使用することができる。SDAの商業的起源には、*Trichodesma*属および*Echium*属が含まれる。GLAの商業的起源には、メマツヨイグサ、クロフサスグリおよびルリチシャが含まれる。しかしながら、天然起源からPUFAを商業的に製造することに関連したいくつかの欠点がある。動物、植物などのPUFAの天然起源は、非常に不均一な油組成を有する傾向にある。したがって、これらの起源から得た油は、1以上の所望のPUFAを分離したり又は1以上のPUFAに富む油を製造するためには、徹底的な精製を要する可能性がある。また、天然起源は、入手可能性において、制御できない変動にさらされる。魚類のストック (stocks) は、自然変異を受けたり、あるいは乱獲により枯渇する可能性がある。魚油は不快な風味および香りを有し、それは、所望の製品から経済的に分離することが不可能な場合があり、そのような製品を食物補充剤として許容できなくする場合がある。動物油、および特に魚油は、環境汚染物質を蓄積する可能性がある。天候および疾患が、魚および植物の両方の起源からの収量の変動を引き起こす可能性がある。代替油産生作物の生産のための利用可能な農耕地は、人口の一定の増加と、それに関連した、残りの耕地上の食物生産に対する需要の増加とからの競合にさらされる。PUFAを産生する作物 (例えば、ルリチシャ) は、商業的栽培に順応化されておらず、単一栽培においては十分に得られない可能性がある。したがって、そのような作物の栽培は、より有益かつ定評ある作物の栽培が可能な場合には、経済的な競争力を有さない。また、*Mortierella*などの生物の大規模発酵は非常

に高くつく。天然動物組織は、少量のARAしか含有せず、加工が困難である。Por

phyridium、Mortierellaなどの微生物は、商業的規模で培養することが困難である。

PUFAを含有する食物補充剤および医薬製剤は、PUFA源の欠点を保有している可能性がある。魚油カプセルなどの補充剤は、特定の所望の成分を低レベルでしか含有していないことがあり、したがって大用量を要する。高用量は、汚染物を含む望ましくない成分の高レベル摂取につながる。過剰添加は、内因性生合成経路の阻害を引き起こし、*in vivo*における種々の脂質画分中の他の必要な脂肪酸との競合を引き起こし、望ましくない結果を招く可能性があるため、脂肪酸補充剤を与える際には注意しなければならない。例えば、 ω^3 脂肪酸に富む食物を摂取するエスキモー人は、高い出血傾向を有する(米国特許第4,874,603号)。該補充剤の不快な風味および香りは、そのような投与計画を望ましくないものにするところがあり、患者による応諾を妨げる可能性がある。

PUFAの生合成には多数の酵素が関与している。リノール酸 (LA, 18:2 $\Delta^9, 12$) は、 Δ^{12} -デサチュラーゼによりオレイン酸 (18:1 Δ^9) から産生される。GLA (18:3 $\Delta^6, 9, 12$) は、 Δ^6 -デサチュラーゼによりリノール酸 (LA, 18:2 $\Delta^9, 12$) から産生される。DGLA (20:3 $\Delta^8, 11, 14$) からのARA (20:4 $\Delta^5, 8, 11, 14$) の産生は、 Δ^5 -デサチュラーゼにより触媒される。しかしながら、動物は、 Δ^9 位を超えて不飽和化することができないため、オレイン酸 (18:1 Δ^9) をリノール酸 (18:2 $\Delta^9, 12$) に変換することができない。同様に、哺乳類は、 α -リノレン酸 (ALA, 18:3 $\Delta^9, 12, 15$) を合成することができない。真菌および植物を含む他の真核生物は、 Δ^{21} および Δ^{15} 位で不飽和化する酵素を有する。したがって、動物の主要な多不飽和脂肪酸は、食物に由来するか、および/または、リノール酸 (18:2 $\Delta^9, 12$) もしくは ω -リノレン酸 (18:3 $\Delta^9, 12, 15$) の不飽和化および伸長に由来する。

多不飽和脂肪酸は、栄養学的、薬学的、産業的な目的や、他の目的において有用であると考えられる。天然起源から得た、および化学合成による多不飽和脂肪酸の供給の拡大では、商業的な需要には十分ではない。したがって、これらの脂肪酸を天然で産生する種から、PUFAの生合成に関与する遺伝物質を得ること、

および商業的量の1以上のPUFASを産生するよう操作することができる異種系において該単離物を単独でまたは組み合わせで発現させることに、関心が持たれている。

Δ^6 -デサチュラーゼによる γ -リノレン酸の製造は、米国特許第5,552,306号および米国特許第5,614,393号に記載されている。Mortierella alpinaを使用する8,11-エイコサジエン酸の製造は、米国特許第5,376,541号に開示されている。双鞭毛藻類によるドコサヘキサエン酸の製造は、米国特許第5,407,957号に記載されている。ルリチシャからの Δ^6 -デサチュラーゼのクローニングは、PCT公開WO 96/21022に記載されている。 Δ^9 -デサチュラーゼのクローニングは、公開されている特許出願PCT WO 91/13972、EP 0 550 162 A1、EP 0 561 569 A2、EP 0 644 263 A2およびEP 0 736 598 A1および米国特許第5,057,419号に記載されている。種々の生物からの Δ^{12} -デサチュラーゼのクローニングは、PCT公開WO 94/11516および米国特許第5,443,974号に記載されている。種々の生物からの Δ^{15} -デサチュラーゼのクローニングは、PCT公開WO 93/11245に記載されている。Thumbergia alataからの Δ^6 パルミトイル-アシル輸送タンパク質デサチュラーゼおよび大腸菌中でのその発現は、米国特許第5,614,400号に記載されている。35Sプロモーターを用いたトランスジェニック大豆胚における大豆ステアリル-ACPデサチュラーゼの発現は、米国特許第5,443,974号に開示されている。

発明の概要

植物および植物細胞における多不飽和長鎖脂肪酸およびデサチュラーゼの製造のための新規組成物および方法を提供する。該方法は、宿主植物細胞内で機能する発現カセットで形質転換した目的の宿主植物細胞を増殖することを含み、該発現カセットは、PUFAの産生をモジュレートすることができるデサチュラーゼポリペプチドをコードするDNA配列にリーディングフレーム5'で結合した転写および翻訳開始制御領域を含んでなる。該デサチュラーゼポリペプチドの発現は、PUFA生合成に関与する酵素の濃度の変化の結果として、宿主植物細胞の該PUFAのプロフィールの変化をもたらす。特に興味深いのは、植物組織および/または

葉、根、果実および種子などの植物部位におけるPUFA産生の選択的制御である。

本発明は、例えばDHA、EPA、ARAおよびGLAの大量生産、および食用植物組織および／または植物部位の脂肪酸プロフィールの修正に有用である。

本発明はさらに、配列番号1～配列番号52に記載のヌクレオチドおよびペプチド配列に実質的に関連するまたは相同である精製されたヌクレオチド配列またはポリペプチド配列をさらに含む。本発明はさらに、発現系の成分として及びトランスジェニック油の製造に有用な系の成分として関連配列を同定するためのプローブとして、配列番号1～40に記載の配列を使用する方法に関する。

本発明はさらに、本発明の長鎖脂肪酸を含む液体または固体の形態である、配合物または食物補充剤に関する。これらの配合物および補充剤は、ヒトまたは動物に投与することができる。

本発明の配合物および補充剤は、ヤシ油、大豆油、カノラ油、モノおよびジグリセリド、グルコース、食用ラクトース、電気透析されたホエー、電気透析された脱脂乳、乳ホエー、大豆タンパク質ならびに他のタンパク質加水分解物よりなる群から選ばれる少なくとも1つの多量栄養素を更に含むことが可能である。

本発明の配合物は、ビタミンA、C、D、EおよびB複合体よりなる群から選ばれる少なくとも1つのビタミンと、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、ナトリウム、カリウム、リン、銅、塩化物、ヨウ素、セレンおよび鉄よりなる群から選ばれる少なくとも1つのミネラルとを更に含むことが可能である。

本発明はさらに、多不飽和脂肪酸の不十分な摂取または産生により引き起こされる状態を有する患者の治療方法であって、該患者の治療を行なうのに十分な量の本発明の食物代用物を該患者に投与することを含んでなる方法に関する。

本発明はさらに、本発明の物質の化粧用および医薬組成物に関する。

本発明はさらに、製薬上許容される担体中のトランスジェニック油に関する。本発明はさらに、トランスジェニック油を含有する栄養補充剤、化粧剤および乳幼児用配合物に関する。

本発明はさらに、脂肪酸分子を該脂肪酸分子のカルボキシル末端から5、5または12番目の炭素において不飽和化するトランスジーン発現産物をコードするトランスジーンを含有する細胞を有する微生物を増殖させる工程を含んでなる、

改変された長鎖多不飽和脂肪酸生合成を得るための方法であって、該トランスジーンが発現されて該細胞内の長鎖多不飽和脂肪酸の生合成が改変される条件下、該トランスジーンが、機能しうる形で発現制御配列に連結されていることを特徴とする方法に関する。

本発明はさらに、ビタミン、ミネラル、炭水化物、糖、アミノ酸、遊離脂肪酸、リン脂質、抗酸化剤およびフェノール化合物からなる群より選択される少なくとも1つの栄養素を含む、医薬組成物に関する。

図面の簡単な説明

図1は、藻類、*Mortierella*およびヒトを含む種々の生物に由来するパルミチン酸 (C_{16}) からアラキドン酸 ($20:4 \Delta 5, 8, 11, 14$) およびステアリドン酸 ($18:4 \Delta 6, 9, 12, 15$) の合成のための可能な経路を示す。これらのPUFAは、ヒトおよび他の動物に重要な他の分子（プロスタサイクリン、ロイコトリエンおよびプロスタグランジンを含み、それらのいくつかが示されている）の前駆体として機能することが可能である。

図2は、種々の生物からまとめた、ARAに加えてEPAおよびDHAを含むPUFAの産生のための可能な経路を示す。

図3A~Eは、*Mortierella alpina* $\Delta 6$ -デサチュラーゼのDNA配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

図4は、*Mortierella alpina* $\Delta 6$ -デサチュラーゼアミノ酸と、他の $\Delta 6$ -デサチュラーゼおよび関連配列（配列番号7、8、9、10、11、12および13）とのアライメントを示す。

図5A~Dは、*Mortierella alpina* $\Delta 12$ -デサチュラーゼのDNA配列（配列番号3）および推定アミノ酸配列（配列番号4）を示す。

図6は、PCR断片の推定アミノ酸配列（配列番号14）を示す（実施例1を参照されたい）。

図7A~Dは、*Mortierella alpina* $\Delta 5$ -デサチュラーゼのDNA配列（配列番号5）を示す。図8は、*Mortierella alpina* $\Delta 5$ -デサチュラーゼのタンパク質配列（配列番号6）と、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼおよび関連配列（配列番号15、16、17、

18) とのアラインメントを示す。図9は、Ma29のタンパク質配列およびコンティグ253538aとのアラインメントを示す。図10は、Ma524のタンパク質配列およびコンティグ253538aとのアラインメントを示す。

配列表の簡単な説明

配列番号1は、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼのDNA配列を示す。

配列番号2は、*Mortierella alpina* Δ 6-デサチュラーゼのアミノ酸配列を示す。

配列番号3は、*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼのDNA配列を示す。

配列番号4は、*Mortierella alpina* Δ 12-デサチュラーゼのアミノ酸配列を示す。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 98/07421	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/53 C12N15/82 C12N5/10 C12P7/64 C11B1/00 A61K31/20 A23L1/30 A23K1/00			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12P C11B A61K A23L A23K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO 93 06712 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 15 April 1993 cited in the application see the whole document ---	20-22	
X	WO 94 18337 A (MONSANTO CO ; UNIV MICHIGAN (US); GIBSON SUSAN IRMA (US); KISHORE G) 18 August 1994 * see the whole document, esp. claims 8-10 *	20-47	
X	WO 96 21022 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11 July 1996 cited in the application * see the whole document, esp. p. 2 1.3-21 * --- -/-	20-47	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
21 August 1998		03/09/1998	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2250 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Tr. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kania, T	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/US 98/07421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 561 569 A (LUBRIZOL CORP) 22 September 1993 cited in the application see the whole document	20-47
A	COVELLO P. ET AL.: "Functional expression of the extraplastidial Arabidopsis thaliana oleate desaturase gene (FAD2) in Saccharomyces cerevisiae" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 111, no. 1, May 1996, pages 223-226, XP002075211 see the whole document	1-51
A	WO 94 11516 A (DU PONT ;LIGHTNER JONATHAN EDWARD (US); OKULEY JOHN JOSEPH (US)) 26 May 1994 cited in the application see the whole document	1-51
T	WO 97 30582 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONSANTO COMPANY INC (US); BROUN PIER) 28 August 1997 see the whole document	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 98/07421

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 23, 42, 43
are directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 98/07421

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (group of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1-47, 49,50

Nucleic acid constructs comprising delta-5, delta-6, or delta-12 desaturases according to SEQ ID NO: 1,3,5, derived from the fungus *Mortierella alpina*.

Recombinant plant cells comprising said constructs.

Methods for obtaining altered long chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis using plants comprising delta-5, delta-6, or delta-12 desaturases, or combinations thereof, derived from fungi or algae.

Plant oils derived from said plants and their use for therapeutical, nutritional, and cosmetical purposes, as well as products derived therefrom.

2. Claim : 48

An isolated sequence comprising the nucleotide sequence selected from the group of SEQ ID NO: 38-44, wherein said nucleotide is expressed in a plant cells.

3. Claim : 51

An isolated nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 49-50, wherein said sequence is expressed in a plant cell.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/07421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9306712 A	15-04-1993	AU 667848 B	18-04-1996
		AU 2881292 A	03-05-1993
		BG 98695 A	31-05-1995
		BR 9206613 A	11-04-1995
		CA 2120629 A	15-04-1993
		CN 1072722 A	02-06-1993
		CN 1174236 A	25-02-1998
		CZ 9400817 A	13-09-1995
		EP 0666918 A	16-08-1995
		HU 69781 A	28-09-1995
		JP 7503605 T	20-04-1995
		MX 9205820 A	01-04-1993
		NZ 244685 A	27-06-1994
		US 5552306 A	03-09-1996
		US 5614393 A	25-03-1997
		US 5689050 A	18-11-1997
		US 5663068 A	02-09-1997
		US 5789220 A	04-08-1998
		ZA 9207777 A	21-04-1993
WO 9418337 A	18-08-1994	EP 0684998 A	06-12-1995
		JP 8506490 T	16-07-1996
WO 9621022 A	11-07-1996	US 5614393 A	25-03-1997
		AU 4673596 A	24-07-1996
		CA 2207906 A	11-07-1996
		CN 1177379 A	25-03-1998
		EP 0801680 A	22-10-1997
		US 5789220 A	04-08-1998
EP 0561569 A	22-09-1993	AU 3516793 A	16-09-1993
		CA 2092661 A	14-09-1993
		JP 6014667 A	25-01-1994
		US 5777201 A	07-07-1998
WO 9411516 A	26-05-1994	AU 5407594 A	08-06-1994
		CA 2149223 A	26-05-1994
		EP 0668919 A	30-08-1995
		JP 8503364 T	16-04-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/07421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9730582 A	28-08-1997	AU 2050497 A	10-09-1997

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/20		C 1 1 B 1/00	
A 6 1 P 3/02		C 1 1 C 3/00	
C 1 1 B 1/00		C 1 2 R 1:645)	
C 1 1 C 3/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10		5/00	C
//(C 1 2 N 15/09	Z N A	A 2 3 D 9/00	5 1 8
C 1 2 R 1:645)			
(31)優先権主張番号	0 8 / 8 3 4 , 6 5 5		
(32)優先日	平成9年4月11日(1997. 4. 11)		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(31)優先権主張番号	0 8 / 9 5 6 , 9 8 5		
(32)優先日	平成9年10月24日(1997. 10. 24)		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, L S, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, A Z, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, E E, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, I D, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M D, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, P L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U S, U Z, VN, YU, ZW		
(72)発明者	ムカージ, ブラディブ アメリカ合衆国 43230 オハイオ州, ガ ハンナ, アルカロ ドライブ 1069		
(72)発明者	フアング, ヤン-シェン アメリカ合衆国 43220 オハイオ州, ア ッパー アーリントン, ダンバーズ コー ト 2462		
(72)発明者	サーモンド, ジェニファー アメリカ合衆国 43231 オハイオ州, コ ロンバス, アディロンダック 3702		
(72)発明者	チョーダリー, スニタ アメリカ合衆国 77584 テキサス州, バ ーランド, ウッドバイン プレイス 3419		
(72)発明者	レオナルド, アマンダ, エウン-ヨン アメリカ合衆国 43230 オハイオ州, ガ ハンナ, シェードウッド コート 581		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)